

**Pharmakologische Modulation der Lebenserwartung im Modellorganismus
Caenorhabditis elegans durch Induktion des oxidativen Stoffwechsels**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich – Schiller – Universität Jena

von Sven Brandstädt

geboren am 09. Dezember 1983 in Arnstadt

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Michael Ristow, Jena und Zürich
2. Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Wetzker, Jena
3. Prof. Dr. med. Joachim Spranger, Berlin

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01. Juli 2013

für meine Familie

für Stefanie

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACCORD	Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes
AMP	Adenosin-Monophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BIP	Bezafibrate Infarction Prevention Study
BSA	bovines Serumalbumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CAMKK	Ca ²⁺ / Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Kinase
CDP	Coronary Drug Project
DMSO	Dimethylsulfoxid
e.g.	lateinisch: exempli gratia
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FIELD	Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes Study
GLR	Glukose-Laktat-Ratio
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HDL	High Density Lipoprotein
HHS	Helsinki Heart Study
HMG-CoA	β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-Coenzym A
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
LKB1	Leber Kinase B1, Synonym: Serin Threonin Kinase 11
mTOR/S6K1	englisch: mammalian Target of Rapamycin/ p70 ribosomal S6 protein kinase
n.s.	nicht signifikant
NaClO	Natriumhypochlorit
NAD ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
neg. s.	negativ signifikant

NGM	englisch: nematode growth medium, Nematoden Wachstumsboden
OP50	<i>Escherichia coli</i> Stamm, Uracil-Mangelmutante
PBS	englisch: phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPRE	Peroxisomal Proliferator Response Element
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	Reactive Oxygen Species, Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	englisch: rounds per minute, Runden pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SD	englisch: standard deviation, Standardabweichung
TSC2	Tuberous Sclerosis 2
u. a.	unter anderem
UCP	Uncoupling Protein
vs.	versus
VA-HIT	Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WHO	englisch: World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung und Abstract.....	1
2	Einleitung.....	4
2.1	Alterung und Seneszenz	4
2.2	Oxidativer Stoffwechsel und dessen Bedeutung im Alterungsprozess.....	5
2.3	AMP-aktivierte Proteinkinase.....	7
2.4	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha.....	10
2.5	Zellkultur-basierendes Screening zur Induktion des oxidativen Stoffwechsels	11
2.6	Der Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i>	13
2.6.1	Wissenschaftliche Bedeutung	13
2.6.2	Genetische Konservierung.....	15
2.7	Fibrinsäurederivate als potentielle Effektoren des Alterns	16
2.7.1	Wirkung als Pharmakon.....	16
2.7.2	Studienlage	18
3	Ziele der Arbeit	22
4	Material und Methoden	24
4.1	Geräte, Verbrauchsmaterial, Reagenzien	24
4.2	Zellkultur	27
4.2.1	Hep G2	27
4.2.2	Verwendete Puffer und Lösungen.....	28
4.2.3	Standardmethoden der Zellkultur	28
4.2.4	Screening	30
4.2.5	verwendete biochemische Methoden	32
4.2.5.1	Proteinbestimmung.....	32

4.2.5.2	Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts.....	34
4.2.5.3	Bestimmung des zellulären Glukose-Verbrauchs.....	35
4.2.5.4	Bestimmung der zellulären Laktat-Produktion	36
4.3	Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i>	38
4.3.1	Verwendete Stämme.....	38
4.3.2	Verwendete Puffer und Lösungen.....	38
4.3.3	Standardmethoden zur Haltung <i>Caenorhabditis elegans</i>	41
4.3.4	Lifespan – Assay.....	43
4.3.4.1	Synchronisierung	43
4.3.4.2	Substanzsupplementation	43
4.3.4.3	Experimenteller Ablauf.....	44
4.4	Statistische Analyse	45
4.4.1	Screening	45
4.4.2	Lifespan-Assay	45
5	Ergebnisse	46
5.1	Zellkultur – Screening	46
5.1.1	Phase I.....	46
5.1.2	Phase II.....	50
5.2	Wirkungen der identifizierten Substanzen auf den Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i>	52
5.2.1	Wirkungen im N2 Wildtyp	52
5.2.2	Wirkungen in der <i>nhr-49</i> Mutante	59
6	Diskussion.....	61
7	Schlussfolgerungen	68
8	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	69
Anhang		75
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	75

Tabellarischer Lebenslauf	76
Danksagung	77

1 Zusammenfassung und Abstract

Nach wie vor findet das wissenschaftliche Bemühen zur Erforschung des Alterungsprozesses große Beachtung.

Es ist bekannt, dass unter bestimmten Einflüssen, beispielsweise Kalorienrestriktion, die Lebenserwartung vieler tierischer Lebensformen stark erhöht wird. Dabei gibt es Hinweise, dass durch eine verminderte Kalorienaufnahme, über unterschiedliche Stoffwechselprozesse der mitochondriale Metabolismus derart moduliert wird, dass es zu einer Induktion der oxidativen Phosphorylierung kommt.

Der Suche nach Substanzen, welche in der Lage sind, einen solchen Einfluss zu imitieren, gilt momentan ein hohes wissenschaftliches Interesse in der Hoffnung, die Ergebnisse auch auf andere Spezies, einschließlich des Menschen zu übertragen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Etablierung eines Zellkultur-basierenden Screening-Verfahrens, mit dem eine spezifische Selektion von pharmakologisch interessanten Wirkstoffen in diesem Bezug ermöglicht wird. In dem Mittelpunkt steht dabei die Bestimmung von Parametern des zellulären Energiestoffwechsels, beispielsweise dem ATP Gehalt in Verbindung mit dem Verhältnis von verbrauchter Glukose zu entstandenem Laktat.

Im weiteren Verlauf der Arbeit galt es, die Ergebnisse auf den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, einem etablierten Modellorganismus der Biogerontologie, zu übertragen und dabei Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus zu erhalten.

Unter einer großen Auswahl von pharmakologischen Wirkstoffen, wurde die Gruppe der Fibrinsäurederivate, vertreten durch Clofibrat, Bezafibrat und Fenofibrat als potenziell lebensfördernd identifiziert. Eine Inkubation von Hep G2 Zellen mit einer Konzentration von 100 μM zeigte eine Steigerung des intrazellulären ATP-Gehaltes mit einer Erhöhung des Glukose-Laktat-Ratio nach 24 h, 36 h und 48 h.

Diese Substanzgruppe wurde für eine anschließende Untersuchung im Lifespan-Experiment ausgewählt. Dafür sind Populationen von mehr als 100 Würmer, gehalten auf Agar-Platten, mit der jeweils beigefügten Substanz, in Ihrer Lebensdauer untersucht worden.

Alle eingesetzten Fibrate (Clofibrat, Bezafibrat, Fenofibrat) erhöhten hoch signifikant die mittlere und maximale Lebensspanne des Nematoden *C. elegans* bei einer jeweiligen Konzentration von 10 μ M. Desweiteren zeigte der hochselektive PPAR α - Agonist GW7647 eine identische lebensverlängernde Wirkung.

Die Untersuchung der Fibrate und GW7647 im Lifespan-Experiment des PPAR α -defizientem Homolog *nhr-49* (Stämme *gk405* und *ok2165*) zeigte hingegen eine aufgehobene Wirkung auf die Lebensspanne, verbunden mit einer teilweise lebensverkürzenden Wirkung. Hieraus ist ersichtlich, dass die lebensverlängernde Wirkung der Fibrate abhängig vom PPAR α / *nhr-49* Signalweg ist.

Innerhalb dieser Arbeit ist es gelungen, die pharmakologische Stoffgruppe der Fibrinsäurederivate als eine potenziell lebensverlängernd wirkende Substanzklasse im Modellorganismus *C. elegans* zu identifizieren. Nachweislich werden diese Effekte über eine agonistische Wirkung auf PPAR α vermittelt.

In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Untersuchungen erscheint eine nachfolgende Induktion des mitochondrialen Stoffwechsels wahrscheinlich, was die Übertragung des Ergebnisses auch auf andere Spezies vermuten lässt. Dieser Zusammenhang ist durch zusätzliche Untersuchungen zu klären.

Abstract

Different influences are known to extend life in several species. There is a great deal of evidence that calorie restriction seems to be one of the most important of them.

Recently, various studies found that calorie restriction is associated with an increase of mitochondrial metabolism and oxidative phosphorylation.

The quest for pharmaceuticals to mimic these effects becomes, therefore, one of significant interest.

The aim of this study was to establish a screening method, based on cell culture, to evaluate capable compounds for inducing mitochondrial metabolism and extended lifespan in *Caenorhabditis elegans*, a well studied nematode in biogerontology.

The pharmacological group of fibrates (clofibrate, fenofibrate and bezafibrate) shows in a concentration of 100 μ M the capability for increasing cellular ATP levels and glucose-uptake while decreasing lactate- levels after 24 h, 36 h and 48 h. This seems to correlate with an induction of mitochondrial metabolism.

These fibrates were applied to *C. elegans* Lifespan- assay. In addition, same test was performed with the selective PPAR α agonist GW7647.

Interestingly, all tested compounds (10 μ M clofibrate, 10 μ M fenofibrate, 10 μ M bezafibrate, 1 μ M GW7647) significantly extended the lifespan of observed nematode populations. This effect was abolished in same test procedure using PPAR α homological deficient species *nhr-49/ gk405* and *ok2165*. We conclude, that extended lifespan in *C. elegans* after incubation with fibrates is mediated by activation of PPAR α / *nhr-49*.

Consistent with established knowledge, fibrates are capable of promoting longevity in a PPAR α sensitive manner by downstream activation of an AMPK signaling pathway and associated induction of oxidative phosphorylation.

2 Einleitung

2.1 Alterung und Seneszenz

Seit jeher ist der Wunsch nach Verlängerung des Lebens ein natürliches, menschliches Begehren. Damit einher geht auch die sukzessive Auseinandersetzung des Menschen mit dem Altern, wie Werke sowohl Platons („Politeia“) als auch Ciceros („Peri geros“, „Cato maior de senectute“) bereits in der Antike beschrieben.

Neben dieser bis in unsere heutige Zeit stark diskutierten philosophischen Altersforschung konnte gerade im letzten Jahrhundert der Grundstein für eine naturwissenschaftliche objektivierbare Forschung über die Grundprinzipien des Alterns gelegt werden.

Ein wesentliches Thema dieser, als Biogerontologie bezeichneten Disziplin, stellt die Seneszenz dar. Hierunter versteht man die zunehmende Minderung der Leistungsfähigkeit eines Organismus in Verbindung mit einer gesteigerten Mortalität (Kirkwood 2005). Seneszenz kann als ein Teil bzw. Abschnitt des Alterns verstanden werden (Baudisch 2005).

Ein Teil dieses Prozesses ist die Veränderung zahlreicher physiologischer Körperfunktionen, e.g. Abnahme der Vitalkapazität als Marker der Lungenfunktion, die Verminderung der Relation Muskelmasse zu Bindegewebe und die progrediente Entwicklung einer Glukoseintoleranz (1988).

Um diese altersbedingten Erscheinungen zu erklären, ist eine Betrachtung der zugrundeliegenden biochemischen Prozesse unabdingbar.

Eine Schlüsselposition in der Aufrechterhaltung der Zellhomeostase nimmt dabei der mitochondriale Stoffwechsel ein. Wichtige Stoffwechselwege, wie die Möglichkeit zur aeroben Energiegewinnung über die Atmungskette sowie der Krebszyklus oder die β -Oxidation sind hierbei zu erwähnen.

2.2 Oxidativer Stoffwechsel und dessen Bedeutung im Alterungsprozess

Max Rubner äußerte 1908 aus seinen Beobachtungen heraus erstmals die Vermutung, dass die maximale Lebensdauer antiproportional zur Stoffwechselrate eines Organismus ist (Rubner 1908). Infolge dieser Aussage konnte 1928 Raymond Pearl seine „*Rate of Living Hypothesis*“ aufstellen. Diese begründete er aus der Beobachtung einer erhöhten Lebensspanne von Tauflieden bei verminderter Umgebungstemperatur. Daraus schloss Pearl auf ein umgekehrt proportionales Verhältnis von Grundumsatz und maximaler Lebenserwartung (Pearl 1928).

Diese Theorie weiterentwickelnd, wurde 1956 die „*Free Radical Theory of Aging*“ formuliert. Dabei soll es durch Bildung freier Radikale zu kumulativen zellulären und systemischen Schäden kommen, welche zu altersabhängigen Erkrankungen führen können (Harman 1956).

Mit der Entdeckung des Enzyms Superoxiddismutase 1969 wurde ein zusätzlicher Beweis für diese Theorie gefunden. Anhand eines solchen Enzyms, welches gezielt intrazellulär freie Radikale abwehrt, wurde darauf geschlossen, dass Zellen kontinuierlich potentiell schädliche freie Radikale bilden (McCord und Fridovich 1969).

1972 wurde durch Harman beschrieben, dass Mitochondrien sowohl die primäre endogene Quelle von freien Radikalen, als auch das Hauptziel dieser darstellen (Harman 1972). Die somit postulierte „mitochondriale Theorie des Alterns“ wurde fortlaufend diskutiert und weitergehend untersucht.

Als potentielle Quelle der freien Radikale wurde dabei die Atmungskette innerhalb der Mitochondrien identifiziert. Hierbei wird durch Oxidation von NADH/H^+ und FADH_2 über der inneren Membran der Mitochondrien ein Protonengradient erzeugt, dessen Energie schließlich zur Generierung von ATP genutzt wird. Dabei bilden sich ungepaarte Elektronen, welche durch die Übertragung auf Sauerstoffmoleküle hoch reaktive Superoxidanionen bilden (St-Pierre et al. 2002). Das im weiteren Verlauf entstehende Wasserstoffperoxid kann die Organellen-Membran überwinden und beispielsweise durch

Bildung von Hydroxylradikalen mit anderen Zellbestandteilen reagieren und diese somit auch schädigen.

Neben einer möglichen direkten Schädigung von Zellproteinen, sind freie Sauerstoffradikale (ROS) auch in der zellulären Signaltransduktion eingegliedert. Damit einhergehend haben sie Einfluss auf Zellproliferation, Metabolismus und Apoptose (Nemoto et al. 2000, Finkel und Holbrook 2000).

Darüber hinaus konnte im Gegensatz zur Annahme eines rein negativen Wirkens freier Radikale, in neuerer Zeit ein positiver Einfluss durch ROS-Generierung auf die Lebenserwartung festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte ROS-Generierung durch Aktivierung der oxidativen Phosphorylierung eine positive Stressantwort induziert. Durch diesen Stressor kann sich, aufbauend auf dem Prinzip der Hormesis (Southam und Ehrlich 1943), eine Stressresistenz entwickeln, die wiederum einen Schutzmechanismus darstellt. Dadurch kann eine Lebensverlängerung erreicht werden (Calabrese und Baldwin 2002, Schulz et al. 2007). Zusammenfassend kann somit die Induktion der oxidativen Phosphorylierung durchaus eine Verlängerung der Lebenserwartung hervorrufen.

Um die mitochondriale Aktivität und damit einhergehend die zelluläre Energiegewinnung an die individuellen Bedürfnisse der Stoffwechselprozesse anzupassen, bedarf es spezieller Regulationsmechanismen. Von entscheidender Bedeutung erscheint seit kurzer Zeit dabei die AMP-aktivierte Proteinkinase.

2.3 AMP-aktivierte Proteinkinase

Die AMP-aktivierte Proteinkinase konnte erstmals 1973 durch zwei verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander beschrieben werden (Beg et al. 1973, Carlson und Kim 1973). Nach weiterer intensiver Forschung konnte schließlich gezeigt werden, dass es sich dabei um ein und dasselbe Enzym handelt, woraufhin der Begriff der „AMP-aktivierten Proteinkinase“ (AMPK) geprägt wurde (Hardie und Carling 1997).

Seitdem konnte eine Vielzahl an physiologischen Funktionen beschrieben werden, welche eine herausragende Rolle in der Regulierung von Zellzyklus und -überleben spielen. Besonders hervorzuheben ist dabei die Funktion eines „Energiesensors der Zelle“ (Hardie und Carling 1997). Als Schlüsselmolekül des zellulären Energiehaushalts ist es in der Lage, einen Energiemangel durch Detektion des AMP:ATP Verhältnisses zu erkennen und in Form unterschiedlicher zellulärer Antworten in Abhängigkeit der Parenchym-Zugehörigkeit zu reagieren (Osler und Zierath 2008, Hardie und Carling 1997).

Dabei werden ATP-verbrauchende, anabole Stoffwechselwege gehemmt, während ATP-produzierende, katabole Wege wiederum gefördert werden (Hardie und Carling 1997). Durch dieses System ist das Überleben der Zelle, auch unter den Bedingungen eines zellulären Energiemangels, gesichert.

Aufgrund dieser essenziellen Bedeutung innerhalb der Zellhomöostase erscheint es verständlich, dass AMPK ein hochkonserviertes Enzym ist, das in Form verschiedener Homologe in nahezu allen Eukaryoten nachzuweisen ist.

Verschiedene Untersuchungen belegen einen wesentlichen Einfluss der AMPK auf den Alterungsprozess. So konnte im Nematoden *Caenorhabditis elegans* ebenso ein entsprechendes Homolog, AAK-2, identifiziert werden. Dessen Aktivierung kann in diesem Modellorganismus eine Verlängerung der Lebensspanne zur Folge haben (Apfeld et al. 2004).

AMPK gehört zur Gruppe der Serin-Threonin Kinasen und besteht aus 3 Untereinheiten: eine katalytische α -Untereinheit sowie zwei regulatorische Untereinheiten - β und γ (Towler und Hardie 2007).

Während eine Aktivierung über die Phosphorylierung von Threonin-172 der katalytischen Untereinheit stattfindet, wird das zelluläre Verhältnis von AMP:ATP über die AMP-Bindungsstelle der γ -Untereinheit vermittelt (Lage et al. 2008). AMP fungiert dabei als allosterischer Effektor. Desweiteren konnten in jüngster Zeit Hinweise auf eine relativ AMP-unabhängige Beeinflussung durch vorgeschaltete Regulator-Kinasen (engl. upstream) gefunden werden: LKB1 und Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Kinase (CAMKK). Die Kinase LKB1 führt u.a. über eine mögliche Wechselwirkung der Proteinkinase C zu einer AMP-unabhängigen Phosphorylierung von Threonin-172 der AMPK ähnlich wie eine Aktivierung der Kalzium-Calmodulin abhängigen Proteinkinase Kinase (Woods et al. 2003, Hawley et al. 2005, Alessi et al. 2006).

Durch Aktivierung der AMPK wird der Glukose- und Lipidstoffwechsel wesentlich beeinflusst (Abb. 1). In Leber und Herzmuskelzelle kommt es zu einer Induktion der β -Oxidation, während die Lipogenese gehemmt wird. Weiterhin wird die Glukose-Aufnahme im Skelettmuskel stimuliert (Towler und Hardie 2007, Lage et al. 2008).

Durch Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) kommt es zu einer Erhöhung der mitochondrialen Fettsäureaufnahme über die fehlende ACC vermittelte Hemmung der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (Zhang et al. 2009).

Durch die Inhibierung des Leber X Rezeptor α wird die zelluläre Fettsäure-Synthese gehemmt und damit indirekt die Lipogenese beeinflusst (Hwahng et al. 2009).

Daneben ist bereits seit längerem die AMPK-vermittelte Hemmung der hepatischen β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA-Reduktase bekannt, was wiederum zu einer Senkung der Cholesterol-Biosynthese führt (Carling et al. 1989).

Darüber hinaus wurde herausgefunden, dass eine Aktivierung von AMPK über die Phosphorylierung von Tuberous Sclerosis 2 (TSC2) zu einer Hemmung des mTOR/S6K1 Signalweges führt (Inoki et al. 2003).

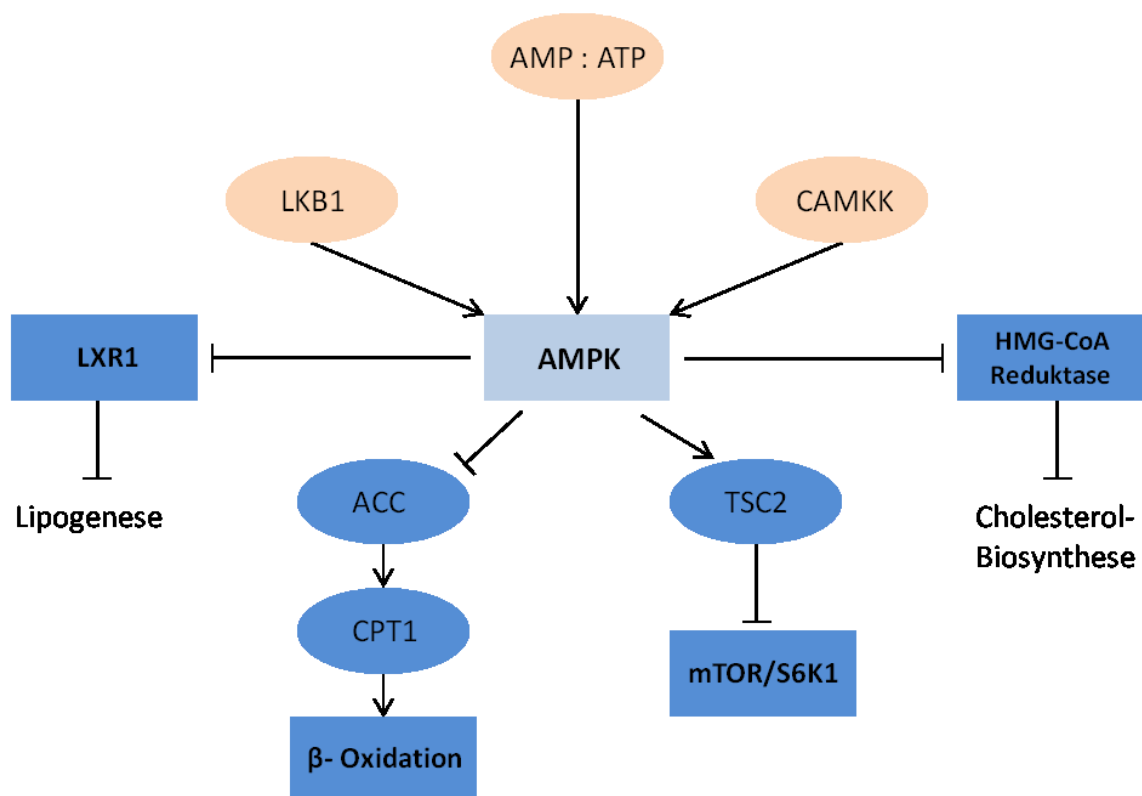


Abb. 1: Die regulatorische Rolle von AMPK im Energiemetabolismus. Modifiziert nach Lee und Kim 2010.

Aufgrund des bedeutenden Einflusses von AMPK auf den zellulären Energiehaushalt, verbunden mit der potentiellen Möglichkeit einer Lebensverlängerung, bekommt die mögliche pharmakologische Beeinflussung zunehmend einen höheren Stellenwert (Zhang et al. 2009). Verschiedenste Substanzgruppen konnten bereits als Aktivatoren beschrieben werden. So steht die Modulation von Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) im Mittelpunkt aktueller Forschung. Sowohl PPAR α - (Chanda et al. 2009, Liangpunsakul et al. 2009) als auch PPAR γ - (Fryer et al. 2002, Saha et al. 2004,

LeBrasseur et al. 2006) und PPAR β/δ - (Narkar et al. 2008, Okazaki et al. 2010) Agonisten wurden als mögliche Aktivatoren des AMPK-Signalweges identifiziert.

2.4 Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha

Die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) gehören der Gruppe von Ligand-aktivierten nukleären Transkriptionsfaktoren an. Nach anfänglicher Isolierung 1990 als nukleäre Rezeptoren, welche die Proliferation von Peroxisomen fördern (Dreyer et al. 1992, Issemann und Green 1990), konnten bisher drei Isotypen identifiziert werden – α , β/δ und γ (Feige et al. 2006). Die Expression der jeweiligen Isoform variiert stark zwischen den Geweben. Während die höchste Konzentration an PPAR α vornehmlich in Gewebe mit hoher Fettstoffwechselrate, wie beispielsweise Leber, Niere, Herz- und Skelettmuskel zu finden ist, wird PPAR γ v.a. in weißem und braunem Fettgewebe exprimiert. PPAR β/δ findet sich gehäuft im Skelettmuskel und Intestinum.

Eine physiologische Aktivierung von PPAR erfolgt durch verschiedene Fettsäure-Derivate (Feige et al. 2006). Dabei zeigen eher ungesättigte als gesättigte Fettsäuren eine höhere Affinität. Desweiteren konnten verschiedene Eikosanoide ebenfalls eine mögliche Aktivierung aller drei Isoformen zeigen. Mit Oleylethanolamid konnte ein hochaffiner natürlicher PPAR α Agonist identifiziert werden, der für seine Appetit-zügelnde Wirkung bekannt ist (Fu et al. 2003).

Nach Aktivierung vermitteln PPAR ihre Wirkung über zwei verschiedene Wege. Einerseits wird eine Transkription für verschiedene, beispielsweise in Energiemetabolismus und Fettsäure-Katabolismus der Leber involvierte Gene induziert. PPAR besitzen jeweils eine Domäne zur Liganden- und DNA-Bindung. Daneben existiert noch eine flexible hinge-Region (Feige et al. 2006).

Nach Bindung eines Liganden erfolgt die Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) als Voraussetzung zu einer stabilen DNA-Bindung. Hierzu erfolgt die

Bindung des PPAR/RXR-Komplexes im Bereich der Promotor-Region des Zielgenes, dem sogenannten *peroxisomal proliferator response element* (PPRE) (Ahmed et al. 2007, Gervois et al. 1999). Anschließend erfolgt die Transkription, deren Protein-Produkte verschiedene Prozesse im u. a. Glukose- und Fettstoffwechsel auslöst.

Daneben wird eine mögliche Wirkung von PPAR durch eine Beeinflussung weiterer Signalwege von Zytokinen wie beispielsweise Tumor-Nekrose-Faktor sowie Interleukin-1 und -6 vermittelt (Marx et al. 2004, Delerive et al. 2000, Gervois et al. 2004).

PPAR α kommt eine große Bedeutung im Bereich des Lipidstoffwechsels zu. Dabei führt eine Aktivierung zu einer Förderung der zellulären und im Verlauf mitochondrialen Fettsäureaufnahme, was schließlich zu einer Induktion der β -Oxidation führt (Gervois et al. 2000). Desweiteren bestimmt PPAR α den Lipoproteinstoffwechsel. Durch Induktion der Lipoprotein-Lipase und ApolipoproteinA-V kommt es zu einer Verringerung der Triglycerid-reichen VLDL-Molekülen, während daneben die hepatische VLDL-Produktion verringert wird. Weiterhin wird der Transport von Cholesterol durch HDL in die Leber gefördert und damit die Anreicherung dessen in peripheren Gewebe und Gefäßen verringert. PPAR α induziert die hepatische Genexpression der Proteine apoA-I und apoA-II, zweier Komponenten von HDL, wodurch dessen Produktion gesteigert wird (Yoon 2009). Daneben wurde herausgefunden, dass auch Gene der Uncoupling Proteins (UCP) in Ihrer Promotor-Region PPRE besitzen, weshalb eine PPAR α -Aktivierung zu einer Induktion von UCP1 im braunen Fettgewebe (Barbera et al. 2001), UCP2 in der Leber (Nakatani et al. 2002) und UCP3 im Skelettmuskel (Brun et al. 1999) führt.

2.5 Zellkultur-basierendes Screening zur Induktion des oxidativen Stoffwechsels

Um Substanzen mit einer möglichen potenziellen Wirkung in Bezug auf die Induktion des mitochondrialen Stoffwechsels aus einer großen Anzahl schnell ausfindig machen zu können, bietet sich ein Screeningmodell auf Zellkulturebene an. Dabei können die Vorteile eines Screenings, wie die schnelle Durchführung, Reproduzierbarkeit und

letztendlich geringere Kosten mit den Vorteilen der Zellkultur wie unter anderem das Nutzen authentischer Signaltransduktionswege und die vergleichsweise einfache Handhabung verbunden werden. Nachteilig ist oftmals eine zu geringe Spezifität und Sensitivität.

Um die Auswirkung auf den menschlichen Stoffwechsel möglichst detailliert untersuchen zu können, stehen eine große Anzahl bekannter humaner Zellkulturstämme, wie beispielsweise Hep G2 (Abb. 3), zur Verfügung. Dieser Zelltyp lässt eine breitbasige metabolische Untersuchung aufgrund seiner parenchymalen Herkunft zu (Darlington et al. 1987).

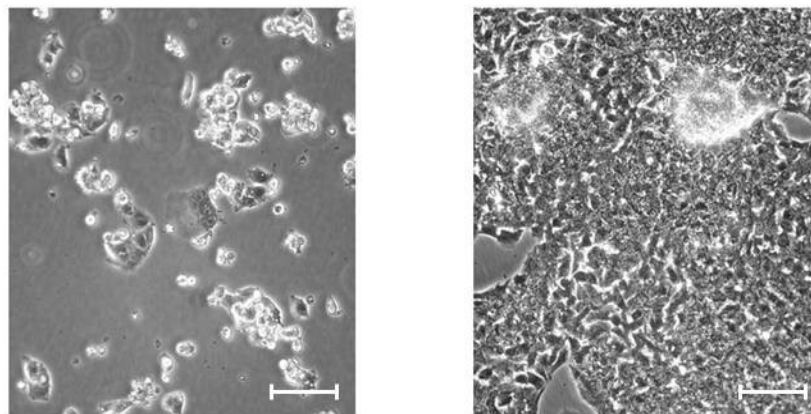


Abb. 3: Mikroskopisches Bild der Hep G2 Zellkultur, geringgradige (links) und hochgradige (rechts) Konfluenz, Skalierungsbalken 100 µm, nach ATCC 2012.

Desweiteren müssen Parameter identifiziert werden, welche eine Interpretation des mitochondrialen Stoffwechsels und damit einhergehend die oxidative Phosphorylierung zulassen. Hierbei erlaubt die Bestimmung von intrazellulärem ATP einen Rückschluss auf die Aktivität der Atmungskette. Weiterhin lässt die Kombination mit dem Verhältnis von verbrauchter Glukose zu abgegebenem Laktat (Glukose-Laktat-Ratio) eine genauere Aussage zur aeroben Glykolyse und Steigerung der mitochondrialen Aktivität zu.

Zur weiteren Untersuchung wurden Substanzen, welche im Zellkulturexperiment eine Steigerung des mitochondrialen Metabolismus zeigten, ausgewählt um deren Einwirken auf einen mehrzelligen Organismus zu betrachten.

Insbesondere zur Erforschung des Einflusses auf die Langlebigkeit stehen der Wissenschaft verschiedene Modellorganismen zur Verfügung, die durch eine kurze Lebensspanne und ethischem Unbedenken charakterisiert sind. Hierbei ist neben der Taufliege *Drosophila melanogaster* und der Backhefe *Saccharomyces cerevisiae* der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* hervorzuheben. Aufgrund des Besitzes verschiedener Eigenschaften eines höheren Organismus und der Möglichkeit einer standardisierten und relativ einfachen Haltung, wurde *C. elegans* als Grundlage für die weiteren Untersuchungen genutzt.

2.6 Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

2.6.1 Wissenschaftliche Bedeutung

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) ist ein im Boden freilebender, sich von Bakterien ernährender, nicht parasitärer Nematode, welcher zur Familie der Rhabditiden gehört. Der etwa 1 mm lange Fadenwurm wurde erstmals 1974 von Sydney Brenner als Modellorganismus auf dem Gebiet der Entwicklungs- und Neurobiologie beschrieben (Brenner 1974). Eine Reihe unterschiedlicher Eigenschaften zeichnen *C. elegans* als einen seitdem an Bedeutung schnell zugenommenen Modellorganismus aus (Byerly et al. 1976).

Sein Entwicklungszyklus, beginnend bei der postembryonalen Entwicklung bis hin zum adulten Tier beschreibt vier Larvenstadien (L1-L4) und dauert bei 20 °C drei Tage. Danach beginnt der adulte Wurm mit der Eiablage (ca. 300-350/ Wurm). Die mittlere Lebenserwartung beträgt bei derselben Temperatur 18 bis 20 Tage (Olsen et al. 2006). Unter ungünstigen Lebensbedingungen, wie Nahrungsknappheit oder eine zu hohe Populationsdichte, können L2 – Larven in ein reversibles Dauerlarvenstadium eintreten,

wodurch ein Überleben auch ohne Nahrungszufuhr über Monate möglich ist (Cassada und Russell 1975). Nach Verbesserung der Lebensbedingungen kann sich die Dauerlarve ihrem normalen Lebenszyklus wieder annähern.

Der Wurm tritt in zwei unterschiedlichen, dimorphen Geschlechtern auf. Die Geschlechtsentwicklung hängt von der Anzahl der vorhandenen X-Chromosomen pro Zelle ab. Ein Hermaphrodit besitzt zwei Gonosomen (XX), währenddessen männliche Vertreter ein Gonosom besitzen (X0). Männchen entstehen durch spontane Non-Dysjunction und machen ca. 0,05 % einer Population vom Wild-Typ Wurm aus. Hermaphroditen können sich selbst fortpflanzen sowie in seltenen Fällen durch Paarung mit Männchen.

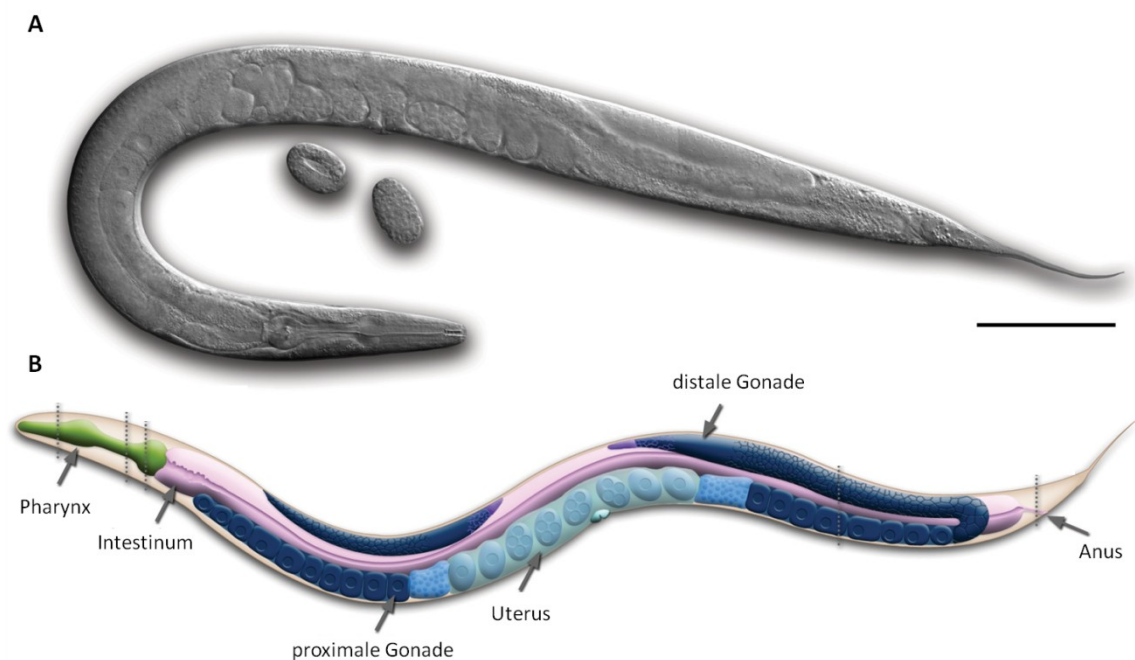


Abb. 4: Darstellung *C. elegans*, adulter Hermaphrodit, Skalierungsbalken rechts 0,1 mm, A mikroskopische Bild mit 2 Eiern, B schematische Darstellung, modifiziert nach Altun 2009.

C. elegans zeichnet sich durch eine weitgehende Zellkonstanz aus. Die Eutelie umfasst bei Hermaphroditen exakt 959 Zellen und bei männlichen Würmern 1031 Zellen.

Im Zuge vieler molekularbiologischer Fortschritte konnte 1998 das Genom von *C. elegans* vollständig sequenziert werden. Durch die Entwicklung der genetischen Manipulation durch RNA Interference (RNAi) (Dudley und Goldstein 2005) sowie das Vorhandensein einer großen Anzahl an Mutanten machen diesen Organismus zu einem wichtigen Modellorganismus.

2.6.2 Genetische Konservierung

Eine große Anzahl an physiologischen biochemischen Abläufen in *C. elegans* wie beispielsweise die Atmungskette, der Krebszyklus oder die β -Oxidation sind genetisch hoch konservierte Abläufe, die einen Vergleich mit dem humanen Stoffwechsel erlauben (Kaletta und Hengartner 2006). So konnten bisher Homologien für über 60-80 % menschlicher Gene gefunden werden. Somit erlaubt die Kenntnis zwischen menschlichem Gen und *C. elegans* Homolog eine meist suffiziente Beobachtung der Auswirkung auf einen *in vivo* Organismus.

E.g. konnte für den humanen PPAR α das Homolog *nhr-49* entdeckt werden. Das Ausschalten dieses Schlüsselgens zeigte eine Inhibierung der PPAR α spezifischen Proteine, verbunden mit einer Senkung der Lebensspanne von *C. elegans* (Van Gilst et al. 2005b, Van Gilst et al. 2005a). Aktuell stehen drei verschiedene Phenotypen zur Verfügung.

2.7 Fibrinsäurederivate als potentielle Effektoren des Alterns

Die Substanzgruppe der Fibrinsäurederivate (Synonym: Fibrate) findet seit vielen Jahrzehnten Anwendung in der Medizin. Sie sind Carbonsäuren, welche sich durch das Vorkommen eines gemeinsamen molekularen Elements, dem 2-Hydroxy-2-Methylpropionsäure-Rest, ähneln (Sierra et al. 2007).

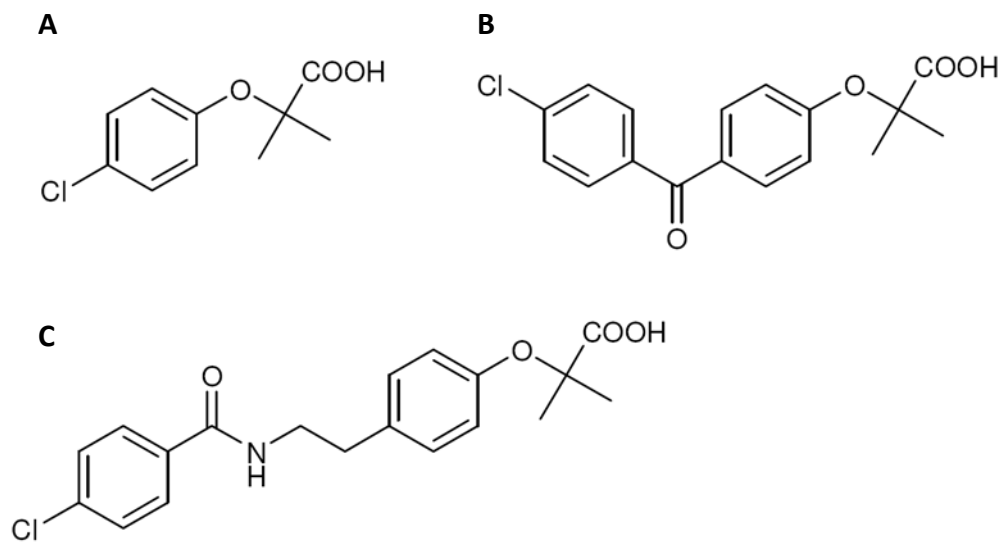


Abb. 2: Chemische Struktur von A Clofibrat, B Fenofibrat, C Bezafibrat.

2.7.1 Wirkung als Pharmakon

Seit den 60er Jahren werden Fibrate als lipidsenkende Pharmaka eingesetzt. In den USA erfolgte der erste Einsatz von Clofibrat 1967. Etwas später folgte der Gebrauch von Fenofibrat im europäischen Raum (Backes et al. 2007). Im Weiteren fanden Bezafibrat und Gemfibrozil eine gelungene Markteinführung (Forman et al. 1997, Svoboda und Azarnoff 1966).

Nach dem anfänglich sehr weit gefasstem Indikationsspektrum führten schließlich kontrovers zu diskutierende Studienresultate, Sicherheitsbedenken und schließlich die erfolgreiche Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern, wie Statine, zu einer kontinuierlichen Abnahme des Einsatzes. In der Bundesrepublik Deutschland wurden 1978, aufgrund des Verdachts auf eine Erhöhung der Mortalität als Resultat der WHO-Studie (s. unten), sämtliche Fibrinsäurederivate als Arzneimittel verboten. Kurze Zeit später wurden Fenofibrat und Bezafibrat erneut bis *dato* zugelassen, jedoch die Indikation strenger gestellt.

So besteht die Indikation zur Pharmakotherapie mit Fibraten bei schwerer Hypertriglyzeridämie sowie gemischter Hyperlipidämie, wenn die Therapie mit einem Statin kontraindiziert ist. Weiterhin besteht für die Kombinationstherapie mit einem Statin lediglich eine Indikation für Fenofibrat bei Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko, falls eine Statin-Monotherapie nicht ausreicht (Arzneimittel 2011b, Arzneimittel 2011a).

Eine Therapie mit Fibraten führt zu einer Reduktion der intravasalen Triglycerid- (20-50 %) und LDL-Konzentration (5-20 %), während es zu einem Anstieg der HDL- Konzentration um 10-35 % kommt (NCEP 2002).

Während der Wirkmechanismus zunächst unklar blieb, so konnte spätestens 1990 durch die erstmalige Klonierung eines, durch Clofibrat aktivierbaren, nukleären Rezeptors (PPAR α) eine direkte Wirkungsweise aufgedeckt werden (Isseman und Green 1990). Die Wirkungsweise beruht auf verschiedenen Schritten zur Beeinflussung des Fettstoffwechsels. Hauptursächlich hierfür ist die Fibrat-spezifische agonistische Wirkung auf den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor α (PPAR α) und die damit verbundene komplexe Beeinflussung des Energie- und Fettstoffwechsels (Staels et al. 1998, Barbier et al. 2002).

Wie bereits erwähnt, gibt es zusätzlich seit kurzer Zeit Hinweise über eine PPAR α vermittelte Aktivierung der AMPK. Dies lässt die Vermutung zu, dass ebenso ein

lebensverlängernder Effekt, wie bei AMPK beobachtet, durch den übergeordneten Regulationsmechanismus der PPAR α -Aktivierung vermittelt werden kann.

2.7.2 Studienlage

Im Bereich der Lipid- senkenden Therapie wurde der Einsatz von Fibraten zugunsten der Statine kontinuierlich gesenkt. Als Gründe werden oftmals bessere klinische Ergebnisse im Rahmen von verschiedenen Studien angebracht. Dabei ist ein direkter Vergleich schwer objektivierbar. Hauptaugenmerk wurde oftmals auf die Reduzierung von LDL gelegt. Während in den letzten 20 Jahren Daten von mehr als 30 großen Studien über die Bedeutung von Statinen mit über 100 000 Patienten veröffentlicht wurden, stehen demgegenüber lediglich sechs wichtige Studien, einschließlich ca. 18 500 Patienten, über eine Therapie mit Fibrinsäurederivaten (Backes et al. 2007). Innerhalb dieser klinischen Studien kam es oftmals zu widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich Mortalität und Schutz vor kardiovaskulären Ereignissen.

Coronary Drug Project

1975 erfolgte die Veröffentlichung dieser ersten größeren Studie zur Untersuchung der Lipidsenkung durch Fibrinsäurederivate. Untersucht wurde das Potential von Lipid-senkenden Stoffen bei Männern mit vorangegangenen Myokardinfarkt. Dabei konnte nach einer Beobachtungszeit von 5 Jahren eine Reduzierung von kardiovaskulären Ereignissen um 9 % in der Clofibrat-Gruppe erreicht werden. Interessanterweise war die Gesamtmortalität annähernd identisch (Anonymous 1975).

Studie der Weltgesundheitsorganisation (WHO)

Hierbei wurden Männern mit Hypercholesterinämie im Alter von 30-59 Jahren zufällig verteilt, jeweils Clofibrat bzw. ein Placebo über die mittlere Dauer von 5,3 Jahren appliziert. Danach konnte eine signifikante Risikoreduktion in der Clofibrat-Gruppe für nicht-tödliche Myokardinfarkte nachgewiesen werden. Allerdings lag die Gesamtmortalität wie auch die Rate an Cholelithiasis und Cholezystektomien signifikant über dem Durchschnitt der Placebo-Gruppe (Anonymous 1978).

Helsinki Heart Study

Im Rahmen der Helsinki Heart Study (HHS) wurden 1987 die Ergebnisse einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie veröffentlicht. Hierbei stand nicht Clofibrat, sondern Gemfibrozil im Mittelpunkt der Betrachtung. Nach 5 Jahren konnte eine signifikante Reduzierung von kardiovaskulären Ereignissen, bei weitestgehend gleichbleibender Gesamtmortalität beobachtet werden. Das Risiko für Cholezystektomien und Krebserkrankungen blieb über die Dauer der Beobachtung gleich (Frick et al. 1987).

Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial

In dieser Studie wurde an Männern mit kardiovaskulärer Erkrankung und bekannt niedriger HDL-Konzentration ebenfalls die Wirkung von Gemfibrozil untersucht. Nach fünfjähriger Beobachtung konnte in der Gemfibrozil-Gruppe ein signifikanter Anstieg der HDL- und Triglyzeridkonzentration bei gleichbleibender LDL-Konzentration festgestellt werden. Daneben konnte erstmalig eine Reduktion der Gesamtmortalität durch Gemfibrozil um 11 % beobachtet werden. Auch hier konnte kein erhöhtes Risiko für Gallenblasenerkrankungen oder Krebserkrankungen festgestellt werden (Rubins et al. 1999).

Bezafibrate Infarction Prevention Study

Innerhalb der BIP- Studie wurde eine mögliche Wirkung von Bezafibrat auf kardiovaskulär erkrankte Männer und Frauen untersucht. Trotz signifikant reduzierter LDL- und Triglyzerid-Konzentrationen, sowie erhöhter HDL-Konzentration, konnte nach 6 Jahren Beobachtung lediglich eine nicht-signifikante Reduzierung an Myokardinfarktrate erzielt werden. Auch die Gesamtmortalität blieb unverändert (Group 2000).

Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes Study

Die 2005/2006 veröffentlichte FIELD Studie betrachtete die Wirkung von Fibraten (Fenofibrat) an Männer und Frauen ohne vorherige Statin-Therapie. Sämtliche Patienten litten an Diabetes mellitus II mit teilweise kardiovaskulärer Vorerkrankung. Es zeigten sich die erwarteten Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel mit der Verringerung von Triglyzerid- und LDL-Konzentration. Die Konzentration an HDL stieg jedoch lediglich um 2 %. Obwohl das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse um 11 % sank, stieg die Gesamtmortalität nicht-signifikant um 19 %, was eine Klärung der pharmakotherapeutischen Rolle der Fibrate weiter offen lässt (Keech et al. 2005).

Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes

Diese erst kürzlich veröffentlichte Studie hatte neben einigen anderen untersuchten Parametern die Aufgabe, den Effekt einer möglichen Statin-Fibrat-Kombinationstherapie ausfindig zu machen. Eine solche Kombinationstherapie ist bis dato in der klinischen Praxis selten. Grund hierfür sind u. a. Berichte über ein erhöhtes Risiko für Myotoxizität mit Rhabdomyolysen und damit verbundenen Todesfällen unter der Therapie von Gemfibrozil mit Cerivastatin (Davidson 2002). Neuere Erkenntnisse untermauern die substanzspezifische Wirkung von Gemfibrozil auf das Cytochrom P450 und eine damit

stark erhöhte Statinkonzentration. Für andere Fibrate konnte ein solcher Zusammenhang nicht identifiziert werden (Backman et al. 2002).

Im Rahmen der ACCORD-Studie wurde die Kombinationstherapie von Fenofibrat mit Simvastatin einer Simvastatin-Monotherapie gegenübergestellt. In der gesamten untersuchten Population konnte kein signifikanter Nutzen einer Kombinationstherapie nachgewiesen werden (Ginsberg et al. 2010). Betrachtet man jedoch lediglich die Patienten, bei denen auch nach jetzigen Leitlinien eine Fibrat-Therapie indiziert wäre (17 % der untersuchten Population), so kann unter der Kombinationstherapie eine deutliche Risikoreduktion in Bezug auf kardiovaskuläre Ereignisse festgestellt werden (Tenenbaum und Fisman 2010).

3 Ziele der Arbeit

Es gibt Hinweise für verschiedenste Mechanismen zur Verlängerung der Lebensspanne in unterschiedlichen Organismen. Einer dieser ist die Kalorienrestriktion. So wurden Studien mit einer großen Anzahl verschiedener Spezies durchgeführt, in denen eine Restriktion der zugeführten Kalorienmenge um 30-50 % zu einer Verlängerung der Lebensspanne führte (Weindruch et al. 1988, Weindruch und Sohal 1997). Während zuletzt eine 2009 veröffentlichte Studie die Senkung der Mortalität einer Rhesusaffenpopulation nach 20 Jahren Beobachtung zeigte (Colman et al. 2009), so konnte bisher eine ähnliche Wirkung auf den Menschen nicht bewiesen werden, da eine solche Untersuchung schwer durchführbar ist.

In jüngster Zeit etablierte sich die Idee der Nachahmung einer Kalorienrestriktion durch Faktoren oder Substanzen, die modulierend in lebensverlängernde Stoffwechselwege eingreifen, ohne die Kalorienaufnahme zu limitieren (Ingram et al. 2004).

Erst kürzlich konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Induktion der mitochondrialen Respiration und einer Lebensverlängerung in *C. elegans* beschrieben werden (Schulz et al. 2007).

Das Ziel der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war es, Substanzen zu identifizieren, welche durch Induktion des oxidativen Stoffwechsels eine lebensverlängernde Wirkung im Modellorganismus *C. elegans* hervorrufen.

In diesem Zusammenhang konnten wir ein Zellkultur-basierendes Screening-Modell erstellen, auf dessen Grundlage die zelluläre ATP- Konzentration in Verbindung mit dem Verhältnis von aufgenommener Glukosemenge zu abgegebener Laktatmenge als Indikatoren für eine gesteigerte oxidative Phosphorylierung untersucht wird.

Im weiteren Verlauf sollte eine potenzielle lebensverlängernde Wirkung im Lifespan-Experiment von *C. elegans* überprüft werden und eine mögliche Wirkungsweise aufgeklärt werden.

Es konnten folgende Hypothesen zur Überprüfung aufgestellt werden:

1. Die Etablierung eines Screeningverfahrens *in vitro*, basierend auf Indikatoren des oxidativen Stoffwechsels, ermöglicht die Identifikation spezifischer Effektoren (Wirkstoffe), welche hinweisend im Modellorganismus *C. elegans* zu einer verlängerten Lebensspanne führen. Eine Erhöhung der zellulären ATP-Konzentration und des Verhältnisses von Glukoseaufnahme zu Laktatabgabe sind hinreichende Eigenschaften hierzu.

Im Verlauf der Untersuchungen ergab sich eine zweite Arbeitshypothese:

2. Fibrinsäurederivate vermitteln klassenspezifisch via Aktivierung des PPAR α eine Lebensverlängerung im Modellorganismus *C. elegans*.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte, Verbrauchsmaterial, Reagenzien

Tabelle 1: Übersicht verwendeter Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Beschreibung	Hersteller
Accu Jet Pro	Brand GmbH & Co KG (Schwertheim, Deutschland)
Analysen / Präzisionswaage XT 120 A	Precisa (Dietikon, Schweiz)
Autoklav Systec V65	Systec (Wettenberg, Deutschland)
Brutschrank Heraeus Haake B6	Kendro (Langenselbold, Deutschland)
Brutschrank TS 606/2-i	WTW (Weilheim, Deutschland)
Combitips plus, 5ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Einkanalpipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Falcons (15ml, 50ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Feinwaage	Sartorius AG Mechatronic
Homogenisator	Schütt Labortechnik GmbH (Göttingen, Deutschland)
Laborflaschen	Duran Group (Mainz, Deutschland) ISO 4796
Löffel-/ Pulverspatel	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Mehrkanalpipetten (Transferpipette manuell/ elektrisch)	Brand GmbH & Co KG (Schwertheim, Deutschland)
Mikrotiterplatten, klar, steril/ unsteril	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Mikrotiterplatten, weiß, steril, Lumineszenz	Greiner Bio-One GmbH (Essen, Deutschland)
Mikrotiterplattenleser Novostar	BMG Labtech (Offenburg, Deutschland)
Multipipette plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Assistent (Sondheim, Deutschland)
Petrischalen, steril (55mm, 100mm)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
pH Meter 766	Knick (Berlin, Deutschland)

Plattenschüttler TitroMax 1000	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Reagensröhren	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
Reagiergefäße, Tubes (0,65ml, 1,5ml, 2ml)	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
Vortex Genie 2 G-560E	Scientific Industries (New York, USA)
Schüttelinkubator 3032	GFL (Großburgwedel, Deutschland)
Schüttelkolben	Duran Group (Mainz, Deutschland)
Serologische Pipetten	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Stereomikroskop SMZ-140	Motic (Wetzlar, Deutschland)
Sterilbank HeraSafe	Heraeus (München, Deutschland)
Sterilbank Gelaire	Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
Stoppuhr	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ultraschallhomogenisator Labsonic M	Braun Biotech (Melsungen, Deutschland)
Wasseranlage Milli-Q Synthesis A10	Millipore (Billerica, USA)
Wasserbad Haake C10-W26	Thermo Electron Corporation (Waltham, USA)
Vakuumsfiltrationsgerät	Schleicher & Schnell Whatman GmbH (Dassel, Deutschland)
Vinothek WT 4176 Grand Cru	Liebherr (Ochsenhausen, Deutschland)
Wipptisch	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Zellkulturenmikroskop CKX 31	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Zellkulturschalen 150mm	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Zentrifuge 5415 D, 5417 R, 5810 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Tabelle 2: Übersicht verwendeter Chemikalien und Reagenzien.

Beschreibung	Hersteller
Agar Agar Serva high strength	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Ammoniumacetat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ampicillin Natriumsalz	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Calciumchlorid	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Cholesterin	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Dikaliumhydrogenphosphat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Fetales Kälberserum	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Glycerol	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Hefe-Extrakt	Fluka (Buchs, Schweiz)
Insulin	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Kaliumchlorid	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumphosphat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumsulfat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhypochlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Nystatin	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Oligomycin	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Pepton from caseine, pancreatic digest	Fluka (Buchs, Schweiz)
Rinderserumalbumin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Schwefelsäure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Stickstoff, flüssig	Linde (Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Trichloressigsäure	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

Tabelle 3: Übersicht verwendeter Assay-Kits.

Beschreibung	Hersteller
Glucose (GO) Assay Kit®	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
L-lactic acid Kit®	R-Biopharm (Darmstadt, Deutschland)
ATP CelltiterGlo-Kit®	Promega (Mannheim, Deutschland)
Pierce BCA Protein Assay Kit®	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Bradford- Reagenz	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

Sämtliche untersuchten Substanzen im Bereich des Zellkulturscreenings einschließlich der Fibrate Clofibrat, Fenofibrat und Bezafibrat sowie GW7647 wurden von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen.

4.2 Zellkultur

4.2.1 Hep G2

Für die Screeningversuche im Zellkulturversuch wurden HEP G2 Zellen eingesetzt. Ursprünglich wurde diese Zelllinie von einem menschlichen hepatozellulärem Karzinom isoliert. Gerade die zahlreich erhaltenen leberspezifischen metabolischen Funktionen dieser Zellen im Glukose- und Fettstoffwechsel ermöglichen eine optimale Untersuchung der pharmakologischen Modulation des Energiestoffwechsels (Stange et al. 1995, atcc 2010).

4.2.2 Verwendete Puffer und Lösungen

RPMI-1640

Dieses weitverbreitete Kulturmedium wurde am Roswell Park Memorial Institute von G. E. Moore und Kollegen entwickelt. Das in den Versuchen eingesetzte Medium wurde von Biochrom AG geordert.

Zum Gebrauch als Kulturmedium wurden zusätzlich 10 % fetales Kälberserum sowie 1 % Penicillin/ Streptomycin zur antibiotischen Prophylaxe zugesetzt.

PBS

80 g NaCl

2 g KCl

12,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$

Einwaage in 1000 ml *aqua bidestillata* mit anschließender pH-Wert Einstellung auf 7,4.

4.2.3 Standardmethoden der Zellkultur

Kryokonservierung

Pro 500 µl Zellsuspension je Kryoröhrchen wurde 1 subkonfluente 15 cm Zellkulturschale geerntet, in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Einfriermedium (50 % RPMI-1640, 40 % FBS, 10 % DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Es folgte die schrittweise

Temperierung auf -80 °C über 24 h und anschließend die permanente Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff.

Rekultivierung

Das Auftauen kryokonservierter Zellen erfolgte am Abend. Dazu wurde das Kryoröhrchen angetaut und die darin enthaltene Zellsuspension rasch in eine zuvor bereits klimatisierte Kulturschale (15 cm Durchmesser) mit Kulturmedium überführt. Am nächsten Morgen erfolgte ein Wechsel des Zellkulturmediums, um darin enthaltene tote Zellen und verbliebenes DMSO zu entfernen.

Kultivierung

Die Hep G2 Zellen wurden in geeignetem Kulturmedium (90 % RPMI-1640, 10 % FBS, 100 U / ml Penicillin, 100 µg / ml Streptomycin) in 15 cm Zellkulturschalen im Brutschrank bei 37 °C, wasserdampfgesättigt unter 5 % CO₂ kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt.

Subkultivierung

Die Zellen wurden subkultiviert, bevor eine Konfluenz des Zellrasens auftrat. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die verbliebenen Zellen mit 10 ml PBS gespült. Zum Lösen der Zelladhärenz wurden 4 ml Trypsin / EDTA (0,25 % / 0,53 mM) aufgebracht und über 2 min im Brutschrank unter 37 °C inkubiert. Anschließend konnten die Zellen leicht durch vorsichtiges resuspendieren mit einer Glaspipette gelöst werden. Die Zugabe

von neuem Kulturmedium stoppte die proteolytische Aktivität des Trypsins und die Zellsuspension konnte auf neue Zellkulturschalen mit Kulturmedium aufgeteilt werden.

Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl pro Volumen Zellsuspension erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer.

4.2.4 Screening

Sämtliche Versuche zum Zellkultur-Screening erfolgten standardisiert in 96-Well-Platten. Hierzu wurden subkonfluente Zellkulturschalen nach der oben beschriebenen Subkultivierungs-Methode „geerntet“. Die gewonnene Zell-Suspension wurde in 50 ml – Falcons mit ausreichender frischer RPMI-1640-Nährlösung gemischt, um eine rasche Deaktivierung der noch verbliebenen Trypsin-Bestandteile zu erreichen. Zusätzlich hierzu erfolgte der zweimalige Austausch der Nährlösung. Nach Zentrifugation der Zellsuspension bei 1000 rpm über 5 Minuten konnte der Überstand mittels Pasteur-Pipette abgesaugt und das verbliebene Zell-Pellet in 50 ml frischem RPMI-1640-Medium resuspendiert werden. Nach weiterer Zentrifugation wurden die Zellen in ca. 2 ml Flüssigkeit belassen und die Zellzahl dieser Suspension, wie oben beschrieben, bestimmt.

Mit einem gewünschten Ausgangsvolumen von 200 µl Medium pro Well sowie darin enthaltenen 40000 Zellen pro Well konnte nun eine entsprechende Stamm-Zell-Suspension hergestellt werden. Diese wurde mittels elektrischer 8-Kanal-Pipette in vorher temperierte 96-Well-Zellkultur-Platten verteilt. Nach 60 Stunden Kultivierung im Brutschrank sind die Zellen ausreichend subkonfluent angewachsen.

Der weitere Versuch wurde mit 0,5 % FKS RPMI-1640 durchgeführt. Im Vorversuch konnte hierbei eine gute Suszeptibilität der Zellen bezüglich der metabolischen

Veränderung bei Insulin-Einwirkung festgestellt werden, bei möglichst niedriger Enzymaktivität der FKS-Bestandteile.

Zur Substanzinokulation wurde das Medium mit einer 8-fach-Saugvorrichtung vorsichtig von einer 96-Well-Platte entfernt und nach Waschen mit 50 µl temperiertem PBS das zuvor vorbereitete RPMI-1640- Medium mit den jeweiligen Substanzen mit einer 8-fach-Mehrkanalpipette zügig aufgebracht.

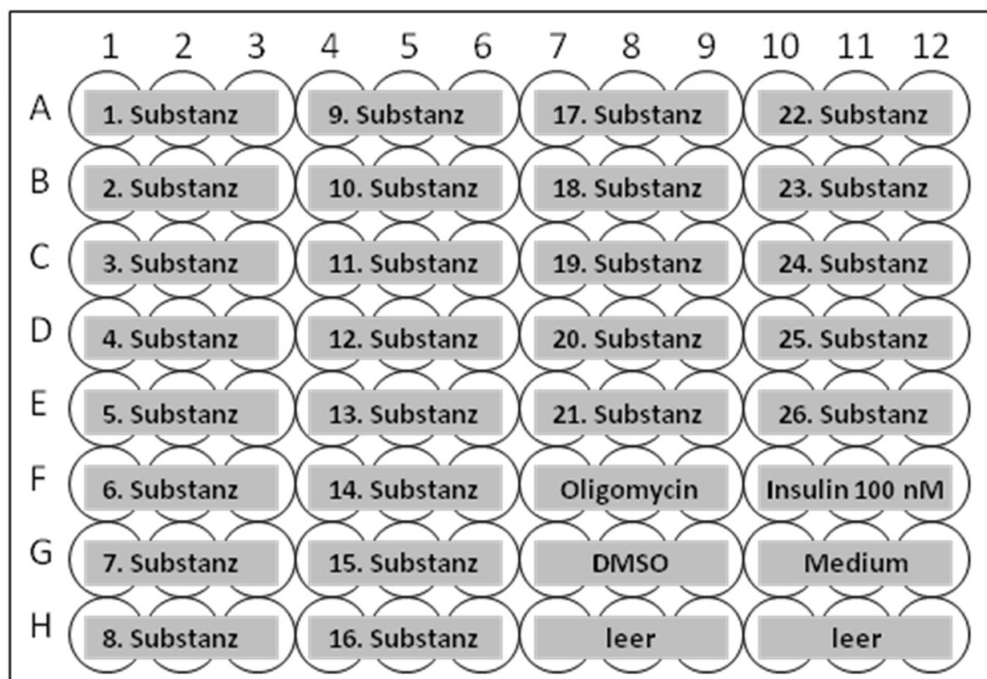


Abb. 5: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung im 96-Well-Plattenformat, Phase I (3-fach Bestimmung).

Zum Zellkultur-Screening bei 3-fach-Bestimmung (Abb. 5) wurde der zelluläre Energie-Metabolismus nach 24 h sowie 48 h untersucht, um auch einen möglicherweise zeitlich versetzten Effekt nachweisen zu können.

Nach einer Vorauswahl der Substanzen wurden die weiteren Versuche mit einer 8-fach-Bestimmung nach 36 Stunden Inokulation untersucht (Abb. 6).

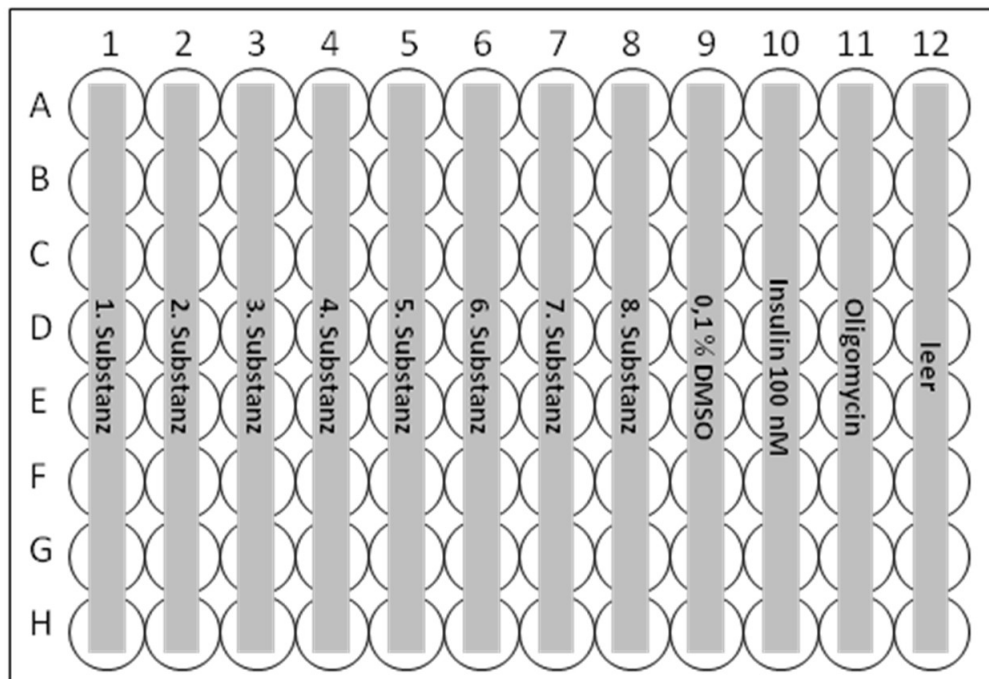


Abb. 6: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung im 96-Well-Plattenformat, Phase II (8-fach Bestimmung).

4.2.5 verwendete biochemische Methoden

4.2.5.1 Proteinbestimmung

Für die jeweils untersuchten Substanzen ist bei der Inkubation der Zellen davon auszugehen, dass die Zellproliferationsrate und damit die Zellzahl vom Ausgangswert stark differiert. Um diesen Faktor auszugleichen, wurde die jeweilige Zellproteinmenge pro Well gemessen. Damit konnten die zu messenden Parameter, wie beispielsweise ATP, auf die Proteinmenge bezogen werden.

Im Verlauf des Projektfortschrittes zwischen Phase I und II (s. unten) erfolgte nach arbeitsgruppeninterner Untersuchungen der Wechsel von der Bradford- hin zur Pierce-

BCA Bestimmungsmethode aufgrund einer besseren Praktikabilität. So war es fortan möglich, die Zellproteinmenge direkt aus dem Zelllysat der ATP-Messung zu quantifizieren, ohne dass sich beide Verfahren, wie bei der Bradford-Methode, gegenseitig beeinflussen.

Mitgeführte Proteinstandards (Rinderserumalbumin) gaben eine Verdünnungsreihe vor und ermöglichten damit die Quantifizierung der zellulären Proteinmenge.

Bradford

Diese Form der quantitativen Proteinbestimmung beruht auf einer spezifischen Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau an basische Aminosäuren des Proteins (Bradford 1976).

In saurer Lösung liegt der Farbstoff in seiner kationischen Form mit einem Absorptionsmaximum von 470 nm vor. Durch Bindung an Proteine bildet sich eine anionische Sulfatform mit einem neuen Absorptionsmaximum von 595 nm. Durch photometrische Messung dieser Absorptionszunahme kann durch Einbeziehung einer Standardgeraden auf die Proteinmenge rückgeschlossen werden.

Im Zellkulturexperiment erfolgte zum Zeitpunkt der Messung das Absaugen des Mediumüberstandes vom Zellrasen und das einmalige Waschen mit PBS. Danach erfolgte die Lysierung des Zellrasens durch Zugabe einer 10 M Natriumhydroxidlösung. Für die anschließende Messung wurden, je nach Standardbereich, jeweils 3-5 µl Zellsuspension in 96-Well-Mikrotiterplatten vorgelegt und mit 250 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach kurzem Durchmischen auf dem Plattenschüttler konnte die Absorption wie oben beschrieben gemessen werden.

Pierce-BCA-Kit

Dieses Verfahren besteht aus zwei Schritten. Im ersten wird die Biuret-Reaktion genutzt, bei welcher Cu^{2+} -Ionen durch die Bindung von Peptiden zu Cu^{1+} reduziert werden. In

einem anschließenden Schritt wird durch Zugabe von Bicinchoninsäure (BCA) mit Cu^{1+} ein Chelatkomplex bilden. Dieser Komplex zeigt eine Lichtabsorption bei 562 nm, welche sich proportional zur Proteinmenge verhält.

Im Zuge der ATP- Messung wird aus dem Zelllysats innerhalb der 96-Well-Mikrotiterplatte nach 15 minütiger Inkubation je 10 μl mit einer Mehrkanalpipette entnommen und in eine leere Mikrotiterplatte gegeben. Nach Zugabe von 100 μl BCA-Gemisches kann nach weiterer 90 minütiger Inkubation unter 37°C die Absorption bei 562 nm gemessen werden. Durch mitgeführte BSA-Standards wird analog zur Bradford-Methode eine Proteinquantifizierung ermöglicht.

4.2.5.2 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts

Es wurde der Kit CelltiterGlo® der Firma Promega zur ATP-Messung in Verbindung mit Bradford-Protein-Kit bzw. Pierce BCA-Kit zur Protein-Quantifizierung verwendet. Sämtliche Versuche fanden in speziellen 96-Well-Platten der Firma Greiner bio-one zur Lumineszenz-Bestimmung statt.

Das grundsätzliche Prinzip dieses Assays besteht in der Oxidation von exogenem Luciferol in Anwesenheit von zellulärem ATP durch eine stabile Luciferase zu einem instabilem Dioxetan, welches unter Emission von Licht zu AMP und CO_2 zerfällt.

Ablauf:

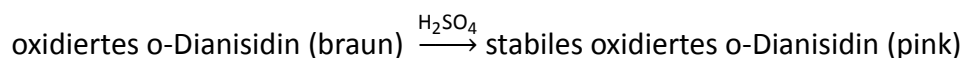
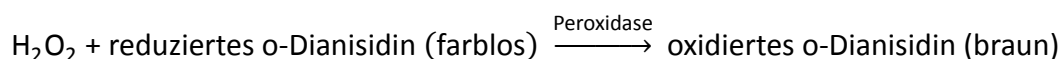
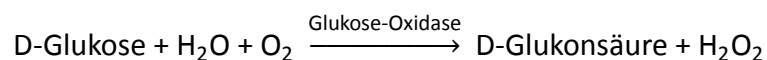
Den vorbehandelten 96 well-Platten mit Zellrasen wird zügig das Medium abgesaugt. Anschließend wird, nach zwischenzeitlicher Zugabe von 50 μl PBS, zügig je 25 μl ATP-Puffer des Assay-Gemischs zu den Wells gegeben. Nach 15-minütiger Inokulation unter permanentem Schütteln ist die Zellsuspension weitgehend lysiert. Zur parallelen Protein-Quantifizierung werden davon nun pro Well 10 μl Zelllysats in zuvor bereitgestellte leere 96 Well-Platten 1:1 übertragen. Sämtlichen Proben, sowohl für die ATP- als auch für die Protein-Bestimmung werden nun 25 μl Substrat des Assays zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur kann die Lumineszenz bestimmt werden und anhand

mitgeführter ATP-Standard-Proben auf die Quantität rückgeschlossen werden. Die nebenbei mitgeführten Protein-Proben werden entsprechend der Bradford-Bestimmungsmethode bzw. des Pierce-BCA-Kit quantifiziert, sodass sämtliche ATP-Messungen pro Well auf die jeweilige Proteinmenge bezogen werden können.

4.2.5.3 Bestimmung des zellulären Glukose-Verbrauchs

Zur Glukose-Quantifizierung wurde der Glucose (GO) Assay Kit® der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Zum Grunde liegt diesem Verfahren die indirekte photometrische Messung eines am Ende einer enzymatischen Reaktionskette stehenden Produktes.

Glukose wird durch Zugabe von Glukose-Oxidase zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid oxidiert. Letzteres wird sofort mit bereitgestelltem o-Dianisidin in reduzierter Form durch eine Peroxidase weiter oxidiert. Das dabei entstehende Produkt wird aufgrund seiner Instabilität durch Zugabe von 6 M Schwefelsäure zu einer stabileren Form umgewandelt, dessen Absorbptionsoptimum bei 560 nm photometrisch bestimmt werden kann. (Bergmeyer und Bernt 1974, Washko und Rice 1961)



Ablauf:

Als Positiv-Kontrolle wurden Zellen mit 100 µM Insulin inkubiert. Ebenso wurde das Zellkulturmedium ohne und mit Glukose-Zusatz als Blindwert bzw. Start-Wert mitgeführt. Ähnlich der ATP-Bestimmung wird den inkubierten 96-Well-Platten mit Zellrasen das überstehende Zellmedium vorsichtig mit einer Mehrkanal-Pipette entnommen und in

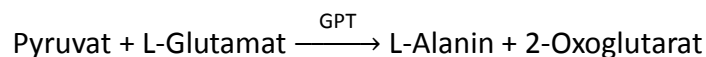
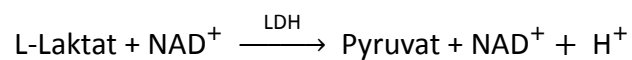
eine leere 96-WellPlatte 1:1 überführt. Die verbliebenen Platten mit Zellen wurden zur Proteinbestimmung weiterverarbeitet.

In den jeweiligen Überständen konnte nun, nach den enzymatischen Reaktionen wie oben beschrieben, photometrisch Absorptionswerte gemessen werden, die sich proportional dem Glukosegehalt verhalten. Unter Abzug des Blindwertes aller Proben und Darstellung der mitgeführten Glukose-Standards einer Standard-Geraden bei linearen Verhältnissen, konnte der jeweilige Glukosegehalt des Zellüberstandes pro Well ermittelt werden. Da der Glukosegehalt zum Startzeitpunkt exakt bekannt ist, lässt sich somit die zelluläre Glukoseaufnahme bestimmen.

4.2.5.4 Bestimmung der zellulären Laktat-Produktion

Für die Bestimmung der L-Laktatbildung wurde der L-lactic acid Kit® (R-Biopharm, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Im Grundprinzip wird vorhandenes L-Laktat durch NAD^+ in Gegenwart der L-Laktatdehydrogenase (LDH) zu Pyruvat oxidiert. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf Seite des Laktats. Durch eine nachgeschaltete Reaktion des Pyruvats in Anwesenheit von Glutamat mithilfe der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) kann jedoch dieses Gleichgewicht umgekehrt werden (Noll 1966).



Die bei dieser Reaktion entstehende Menge NADH/H^+ ist der vorhandenen Laktatmenge äquivalent und kann aufgrund der spezifischen Absorption bei 340 nm photometrisch bestimmt werden.

Ablauf:

Die Bestimmung des Laktat-Gehalts erfolgte aus exakt denselben Medium-Überständen, aus denen bereits die Glukose-Konzentration bestimmt wurde. Um eine Konzentration im detektierbaren Assay-Bereich zu erhalten, wurden Proben nach 24 Stunden Inkubation 1:5 und nach 48 Stunden 1:8 verdünnt und frisches Zellkulturmedium als Ausgangswert mitbestimmt ($E_{\text{Blindwert}}$).

Je Well einer 96er Mikrotiterplatte werden 125 μl verdünntes Probenmaterial mit 125 μl Glycylglycinpuffer, 2,5 μl GPT-Assay-Lösung sowie 25 μl NAD^+ -Assay-Lösung über 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorbtion bei 340 nm, entsprechend einem Blindwert, photometrisch gemessen (E_1). Danach erfolgt die rasche Zugabe von 2,5 μl LDH-Assay-Lösung mit der Mehrkanalpipette und kurzes Schütteln auf dem Plattenschüttler. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation kann erneut die photometrische Bestimmung der Absorbanz bei 340 nm ermittelt werden (E_2).

Durch nachfolgende Berechnung kann die Absorbtion des L-Laktats in der Probe bestimmt werden:

$$\Delta E_{\text{L-Laktat}} = E_2 - E_1$$

$$\Delta E_{\text{Blindwert}} = E_2 - E_1$$

$$\Delta E_{\text{L-Laktat}} - \Delta E_{\text{Blindwert}} = \text{Absorbtion des L-Laktats.}$$

Die Mitführung von L-Laktat-Standards in Form einer Verdünnungsreihe (0-160 $\mu\text{g/ml}$ L-Laktat) erlaubt die Quantifizierung der gemessenen Werte anhand einer Standardgeraden.

4.3 Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

4.3.1 Verwendete Stämme

N2-Bristol

Als Wildtyp wurde der Stamm N2 Bristol verwendet. Eine Ausgangskolonie wurde vom *Caenorhabditis* Genetics Center der Universität von Minnesota, USA bezogen.

nhr-49 - Mutanten

Weiterhin kamen spezielle Stämme mit verschiedenen Mutationen im Bereich des nukleären Hormonrezeptors 49, dem Homolog zum humanen PPAR α zum Einsatz. Zum einen *nhr-49; gk405*, zum anderen *nhr-49; ok2165*.

Auch diese Stämme wurden vom *Caenorhabditis* Genetics Center der Universität von Minnesota, USA bezogen.

4.3.2 Verwendete Puffer und Lösungen

NGM

3,0 g NaCl

2,5 g Pepton (Fluka, Nr.70169, from Casein, pancreatic digest)

17,0 g Agar (high strength) SERVA high gel-strength, No 11396

Einwaage in 1000 ml *aqua bidestillata*. Nach Autoklavieren und langsamen Abkühlen erfolgte das Temperieren auf 55 °C im Wasserbad über mindestens 2 h. Danach unter der Sterilbank Zugabe von 1 M CaCl_2 , 5 mg/ml Cholesterol, 1 M MgSO_4 , 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0), 50 mg/l Nystatin-Lösung. Bei Platten zur Verwendung für LifeSpan-Assays zusätzliche Zugabe von 100 mg/l Ampicillin.

Nach Mischen mithilfe eines Rührstäbchens und erneutem Temperieren erfolgte das Gießen der NGM-Agar-Platten: 10 cm Durchmesser 20 ml, 5 cm Durchmesser 10 ml. Trocknen der Platten über Nacht bei Raumtemperatur und anschließende Aufbewahrung bei 4 °C.

DYT

16,0 g	Bactotrypton (Casein Hydrolysate Peptone No 140)
10 g	Hefe- Extrakt (DIFCO Nr. 212750 oder Fluka 70161)
5,0 g	NaCl

Einwaage in 1000 ml *aqua bidestillata*, Aufteilen auf 500 ml im Erlenmeyerkolben und anschließendes Autoklavieren. Weiterverarbeitung noch am selben Tag.

Nystatin- Lösung

Nystatin dient als Zugabe im NGM-Agar als Fungizid.

200 ml	Ethanol 96 %
115,6 g	Ammoniumacetat
4 g	Nystatin

Lösen von Ammoniumacetat in 200 ml *aqua bidestillata*, Zugabe von Ethanol zu Nystatin und Lösen im Wasserbad bei 50 °C. Nach anschließender Sterilfiltration konnte die Lösung aufgeteilt und bei -20 °C gelagert werden.

Ampicillin- Lösung

Ampicillin dient bei andauernden Experimenten, wie beispielsweise Lifespan-Experimenten als antibiotische Prophylaxe gegenüber Kontaminationen. Hierzu wurde 1 g Ampicillin-Salz in 10 ml *aqua bidestillata* gelöst und sterilfiltriert. Nach aliquotieren erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

Bleichlösung

1400 µl	<i>aqua bidestillata</i>
500 µl	10 N NaOH
1100 µl	12 % Natriumhypochlorit

Unter vorsichtigem Arbeiten erfolgt die Zusammenführung der Substanzen.

S – Basal – Puffer

5,85 g	NaCl
1 g	K ₂ HPO ₄
6 g	KH ₂ PO ₄

Einwaage in 1000 ml *aqua bidestillata* und anschließendes Autoklavieren. Vor Verwendung Zugabe von 10 mM MgSO₄ und 1 ml/L Cholesterol einer zuvor entnommenen Menge zugeben.

Kultivierung und Gebrauch von E. coli, Stamm OP 50

Für die Herstellung der Bakteriensuspension wird steriles DYT-Nährmedium zunächst angeimpft. Hierzu wird unter sterilen Bedingungen eine Pipettenspitze mit angezüchteten *E. coli* (OP50) versetzt und mit der Nährlösung inokuliert. Nach Inkubation über 36 Stunden unter 37 °C im Schüttler (200 rpm) kann die Kultur weiterverarbeitet werden.

Zum weiteren Gebrauch für die *C. elegans* Erhaltungs-Kultur wurde die gewonnene Suspension bei 3220 rpm über 15 Minuten separiert und anschließend in eine 10 fach konzentrierte Lösung resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Im Lifespan Assay fanden ausschließlich hitzeinaktivierte, avitale Bakteriensuspensionen Anwendung. Da somit ein Wachstum des Zellrasens verbunden mit einer ausreichenden Ernährung der Nematoden nicht zu gewährleisten ist, wurde eine 40 fach konzentrierte Bakteriensuspension verwendet. Hierzu erfolgte zunächst eine Hitzeinaktivierung durch 45 minütige Inkubation der angeimpften DYT-Medien bei 65 °C unter ständigem Schütteln. Danach erfolgte die Zentrifugation in oben genannter Weise und die Resuspension des Bakterienpellets in 10 % Volumenanteile S-Basal-Puffer der Ausgangssuspension. Aufgrund einer besseren Praktikabilität wurde nach erneuter Zentrifugation das Bakterienpellet in 2,5 % Volumenanteile S-Basal-Puffer resuspendiert und bis zum weiteren Gebrauch bei – 20 °C gelagert.

4.3.3 Standardmethoden zur Haltung *Caenorhabditis elegans*

Kryokonservierung

Die Eier tolerieren das Einfrieren bis zu -80 °C was eine dauerhafte Aufbewahrung ermöglicht.

Rekultivierung

Das kryokonservierte Eipellet wird rasch auf Raumtemperatur gewärmt und nach kurzer Resuspension mittels Glaspipette auf eine zuvor angeimpfte Erhaltungs-NGM-Platte gegeben. Unter ständiger Kontrolle können die entwickelten Nematoden nach einigen Tagen auf frische Erhaltungs-NGM-Platten umgesetzt werden.

Kultivierung

Sämtliche verwendete *C. elegans* Stämme wurden im Labor monoxenotisch auf NGM-Agarplatten unter standardisierten Bedingungen bei 19 °C gehalten. Um Kontaminationen zu vermeiden wurden sämtliche Arbeiten unter der Vorgabe möglichst steriler Bedingungen durchgeführt.

Subkultivierung

Zweimal wöchentlich wurden ca. 5 Nematoden im späten L4-Larvenstadium auf zuvor frische, mit vitalen Bakterien beimpfte Agar-Platten gesetzt. Bevor Würmer für Versuche verwendet werden konnten, musste über mindestens zwei Generationen eine Haltung unter optimalen Bedingungen gewährleistet sein.

4.3.4 Lifespan – Assay

4.3.4.1 Synchronisierung

Zu Beginn wird eine Nematoden-Population annähernd gleichen Entwicklungsstands benötigt. Um dies zu erreichen, werden Eier mit Hilfe einer „egg-preperation“ auf beimpfte Agar-Platten ausgesetzt. Hierzu werden Würmer mitsamt Eiern von stark besiedelten, großen NGM-Agar-Platten mittels *aqua bidestillata* heruntergespült und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und die so gewonnene Suspension auf 7 ml aufgefüllt. Danach wird die Suspension mit einer zuvor frisch angesetzten hypochlorigen Säure-Lösung (Bleichlösung) versetzt. Durch den sich anschließenden Bleichprozess werden sowohl Nematoden als auch Bakterien zersetzt, während die Eischale eine relativ hohe Bleich-Resistenz besitzt. Nach ca. 10 minütigem ständigem Schütteln wird durch einminütige Zentrifugation die separierte Ei-Suspension vom übrigen Überstand getrennt und das Eipellet mit frischem *aqua bidestillata* resuspendiert. Nach zweimaligem Wiederholen ist der Rest an Bleichlösung vernachlässigbar.

Die so gewonnene Ei-Suspension wird mittels einer Pasteurpipette tröpfchenweise auf bereits angeimpfte 10 cm NGM-Agar-Platten verteilt. Über die Dauer von 3 Tagen erfolgt nun das Heranwachsen der Larven. Danach, sobald die Ei-Legeperiode beginnt, wird eine festgelegte Anzahl Würmer (ca. 150) auf 5 cm NGM-Agar-Platten, welche bereits mit der zu testenden Substanz versetzt wurden, umgesetzt.

4.3.4.2 Substanzsupplementation

Um eine mögliche Metabolisierung der Testsubstanzen durch OP50 Bakterien zu vermeiden, wurden 10 µl der jeweiligen Stammlösung (1000 fache Konzentration) in 100 µl zuvor hitzinaktivierter 40 fach konzentrierter OP50-Bakteriensuspension gegeben und diese anschließend auf einer 50 mm NGM-Agar-Platte mithilfe eines Drigalski-Spatels

verteilt. Die verwendete Substanzmenge bezieht sich dabei auf die Diffusion der Suspension in das Agar-Volumen von 10 ml. In weiteren 2 Stunden erfolgte die Trocknung im Thermoschrank bei 19 °C.

Eine mögliche Supplementation der Substanzen im Agar schon während des Herstellens beim Gießen erschien aufgrund fehlender Expertise bezüglich der Substanz-Thermostabilität bei mindestens 60 °C Verarbeitungstemperatur als nicht empfehlenswert.

4.3.4.3 Experimenteller Ablauf

Die Betrachtung sowie das Umsetzen der Nematoden erfolgt durch ein Stereomikroskop. Etwa 56 h nach Synchronisation werden ca. 150 Würmer, welche sich im Larvenstadium L4 befinden auf die Substanzplatten gesetzt. Über die gesamte Eilege-Periode erfolgt nun das tägliche Umsetzen der untersuchten Population auf frische, vorbereitete Platten. Hierzu bewährte sich ein Umsetzen mithilfe selbstangefertigter Platin-Spatel, welche ein ständiges Ausglühen unter dem Brenner ermöglichen, um somit die Gefahr einer Kontamination deutlich zu senken. Nach Abklingen der Eilege-Periode können die Populationen 2 Tage auf derselben Substanzplatte verbringen. Die Gefahr einer Durchmischung unterschiedlich alter Nematoden ist zu diesem Zeitpunkt äußerst gering. Im Zuge des regelmäßigen Umsetzens der Populationen wird die Anzahl lebender und toter Würmer ermittelt. Würmer mit einem anzunehmenden nicht-natürlichem Tod, beispielsweise durch experimentell verursachte Beschädigung, Gonadenaustritt oder internal hatchings (Schlüpfen der eigenen Nachkommenschaft innerhalb des Körpers eines adulten Tieres) werden ab dem beobachteten Zeitpunkt zensiert. Der Tod wird bei Regungslosigkeit trotz Berührungen mit dem Platinspatel gewertet.

4.4 Statistische Analyse

Statistische Berechnungen wurden sowohl für Screening-Untersuchungen als auch Lifespan-Analysen mittels MS Office Excel 2007 durchgeführt. Zusätzlich kam GraphPad Prism 5.0 zum Einsatz.

Die Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter bzw. gleich dem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ lag.

4.4.1 Screening

Zur statistischen Auswertung der untersuchten Screening-Parameter wurden deren Mittelwerte nach Prüfung auf eine Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov Test) mit Hilfe des Students t-Test bei unabhängigen Stichproben (normalverteilte Stichproben) untersucht.

4.4.2 Lifespan-Assay

Um die im Lifespan-Experiment ermittelten Verhältnisse der prozentualen Menge an lebenden Würmern bezüglich ihrer Lebensdauer statistisch zu bewerten, wurde die Log-Rank-Methode [Ziegler et al 2004] herangezogen. Hierbei werden die Überlebenszeiten statistisch über einen Vergleich der tatsächlich beobachteten und erwarteten Todesfälle analysiert. Da durch die Größe der untersuchten Nematoden-Populationen eine hinreichend große Zahl an beobachteten Todesfällen gewährleistet ist, kann somit von einer χ^2 -Verteilung mit einem Freiheitsgrad ausgegangen werden.

5 Ergebnisse

5.1 Zellkultur – Screening

Im Rahmen der Screening-Untersuchungen war es möglich, durch die Bestimmung des Verhältnisses von aufgenommener Glukose zu abgegebenem Laktat (Glukose-Laktat-Ratio) und anhand der intrazellulären ATP-Konzentration, die unterschiedlichen Auswirkungen der untersuchten Substanzen auf den zellulären Energiestoffwechsel zu quantifizieren. Noch wichtiger ist jedoch die Möglichkeit, diese Parameter später in Bezug zum Alterungsprozess prädiktiv verwenden zu können.

5.1.1 Phase I

Zunächst wurden alle Substanzen nach dem beschriebenen Versuchsaufbau durch Dreifachbestimmung getestet. Zur Überprüfung der Sensitivität wurden insgesamt zwei möglichst identische Versuchsdurchläufe durchgeführt. Dabei konnten sowohl Ergebnisse bestätigt werden, jedoch traten teilweise auch sehr variable Ergebnisse auf.

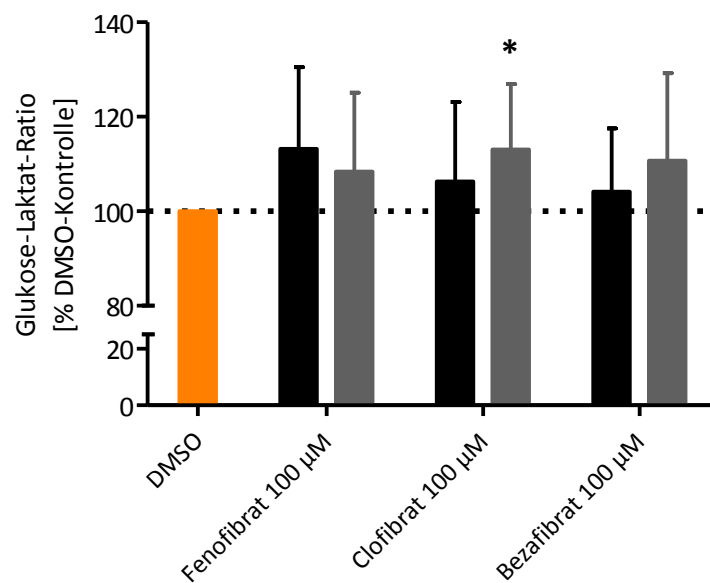
Tabelle 4: Übersicht der Ergebnisse von Screening Phase I. Hierbei wurden die verschiedenen Zeitpunkte der Messung – 24 h und 48 h jeweils einzeln aufgelistet. „+“ positiv, „-/ 0“ negativ.

Anzahl der Substanzen	Glukose-Laktat-Ratio	ATP
58	+	+
20	+	-/ 0
50	-/ 0	+
72	-/ 0	-/ 0

Ein Überblick über die Variabilität der Ergebnisse zeigt Tabelle 4. Hierbei zeigte sich, dass die überwiegende Mehrheit der Substanzen weder den Glukose-Laktat-Ratio (GLR), noch

die zelluläre ATP-Produktion steigern konnten (72 Substanzen). Circa ein Viertel aller untersuchten Substanzen zur jeweiligen Zeit (24 h oder 48 h) zeigten sowohl eine Steigerung des GLR als auch der ATP-Konzentration.

Vor allem Substanzen, die in beiden Durchgängen positive Ergebnisse in Bezug auf Glukoseaufnahme und steigender ATP-Produktion zeigten, wurden für eine nähere Betrachtung ausgewählt. Wie in Abb. 7 und Abb. 8 dargestellt, zeigte insbesondere die Substanzgruppe der untersuchten Fibrinsäurederivate durchgehend als positiv einzuschätzende Ergebnisse.



Substanz	24 h		48 h	
	Mittelwert relativer Glukose-Laktat- Ratio [%]	p-Wert vs. DMSO Kontrolle	Mittelwert relativer Glukose-Laktat- Ratio [%]	p-Wert vs. DMSO Kontrolle
Fenofibrat 100 µM	113.2	0.1239	108.4	0.2461
Clofibrat 100 µM	106.3	0.4282	113.1	* 0.0426
Bezafibrat 100 µM	104.2	0.5134	110.7	0.1875

Abb. 7: Effekte der Inkubation mit Fibraten auf den Glukose-Laktat-Ratio bezugnehmend auf die DMSO-Kontrolle in %, Inkubation: schwarz 24 h, grau 48 h, 3-fach-Bestimmung, 2 Durchläufe, * $p \leq 0,05$.

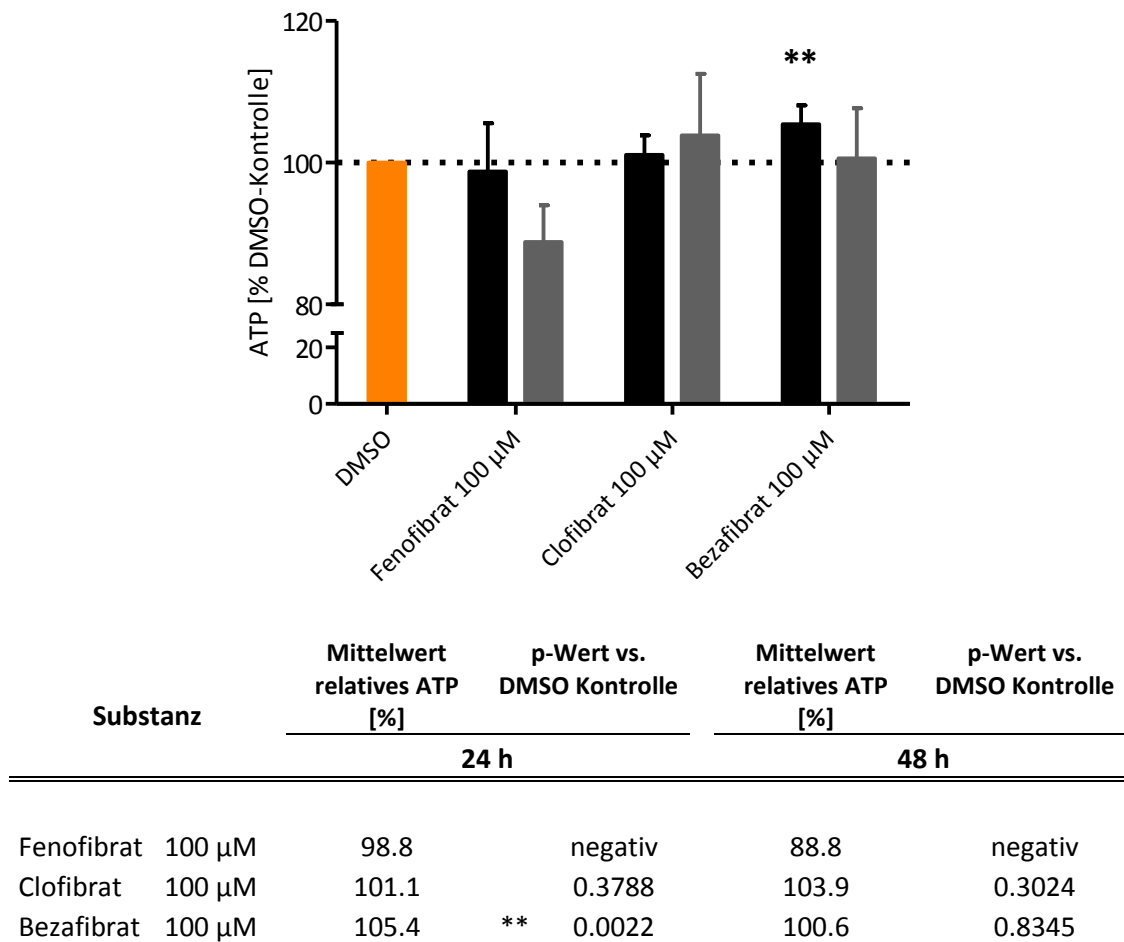


Abb. 8: Effekte der Inkubation mit Fibraten auf den intrazellulären ATP-Gehalt bezugnehmend auf die DMSO-Kontrolle in %, Inkubation: schwarz 24 h, grau 48 h, 3-fach-Bestimmung, 2 Durchläufe, ** $p < 0,01$.

Auffällig war bereits in der ersten Phase des Experiments, dass sowohl Bezafibrat, als auch Clofibrat sowohl nach 24 h als auch 48 h Inkubation die Parameter für den oxidativen Stoffwechsel steigerten. So konnte gezeigt werden, dass Bezafibrat das Verhältnis der zellulären Glukoseaufnahme zur Laktatbildung (GLR) um durchschnittlich 104,2 % nach bereits 24 Stunden steigert. Nach 48 h stieg dieser Wert auf 110,7 % über

dem Durchschnittswert der Kontrolle (DMSO). Dabei konnte ebenfalls der zelluläre ATP-Gehalt signifikant um 105,4 % nach 24 h bzw. 100,6 % nach 48 h gesteigert werden.

Ebenso reagierten die Leberzellen nach einer Exposition gegenüber Clofibrat. Hier konnte nach 24 h ein Anstieg des GLR um 106,3 % bei einer gesteigerten ATP-Konzentration von 101,1 % verifiziert werden. Nach 48 h kam es zu einem weiteren signifikanten Anstieg auf 113,1 % des Glukose-Laktat-Ratio sowie auf 103,9 % des zellulären ATP-Gehalts im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle.

Die dritte Substanz der Fibrinsäurederivate, Fenofibrat konnte diese Ergebnisse nur teilweise zeigen. Dabei kam es sowohl nach 24 h als auch nach 48 h zu einem Anstieg des GLR auf 113,2 % bzw. 108,4 % des Kontrollwertes. Jedoch reagierten die hepatozellulären Zellen jeweils mit einem Abfall des zellulären ATP-Gehalts auf 98,8 % (24 h) und 88,8 % (48 h).

Innerhalb der ersten Phase des Zellkultur-Experiments konnten somit potentielle Substanzen (Fibrate) identifiziert werden, die nach den festgelegten Parametern den mitochondrialen Metabolismus steigern. Zur weiteren Erhöhung der Spezifität galt es nun die Ergebnisse durch eine Erhöhung der Anzahl von Testungen möglichst zu reproduzieren.

5.1.2 Phase II

Innerhalb der zweiten Phase des Experimentes wurden die ausgewählten Pharmaka jeweils in einer 8-fach-Bestimmung unter identischen Bedingungen, diesmal jedoch mit einer 36 stündigen Inkubationszeit getestet. Auch diese Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 und Abb. 10 zusammengestellt.

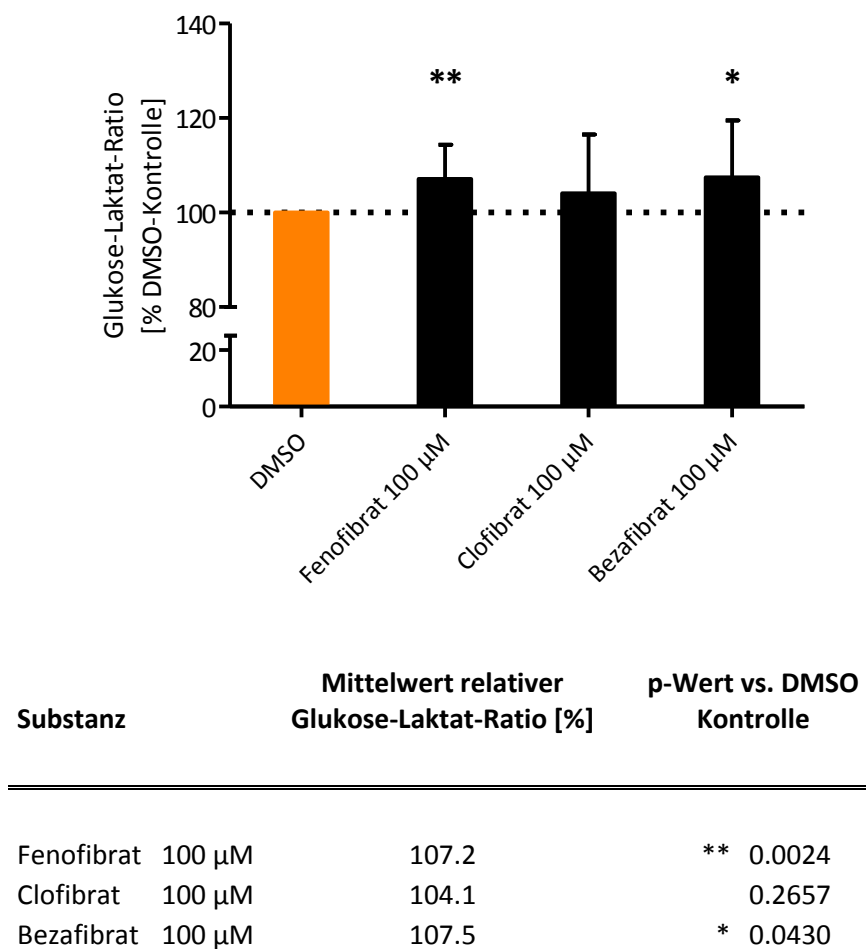
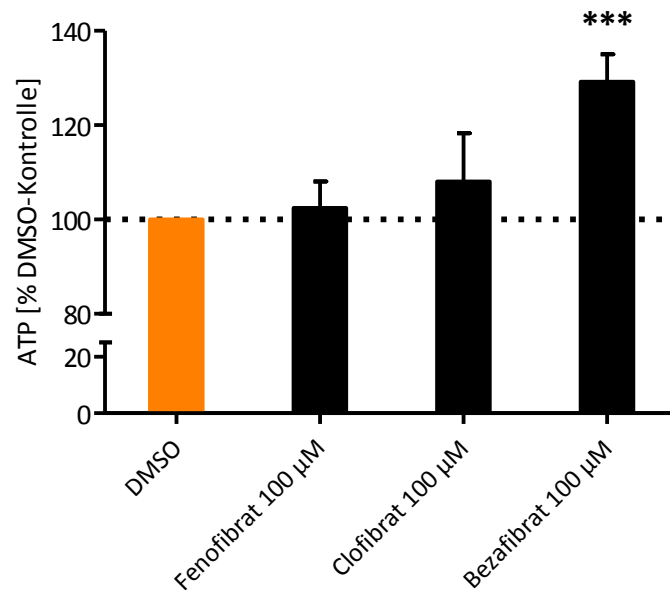


Abb. 9: Effekte der Inkubation mit Fibraten auf den Glukose-Laktat-Ratio bezugnehmend auf die DMSO-Kontrolle in % nach 36 h Inkubation, 8-fach-Bestimmung, 2 Durchläufe, * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$.



Substanz	Mittelwert relatives ATP [%]	p-Wert vs. DMSO Kontrolle
Fenofibrat 100 µM	102.4	0.3131
Clofibrat 100 µM	108.1	0.0797
Bezafibrat 100 µM	129.2	*** < 0.0001

Abb. 10: Effekte der Inkubation mit Fibraten auf den intrazellulären ATP-Gehalt in Bezug auf die DMSO-Kontrolle in % nach 36 h Inkubation, 8-fach-Bestimmung, 2 Durchläufe, *** $p < 0,001$.

Hierbei konnten die Ergebnisse der ersten Phase bestätigt werden. Alle drei getesteten Fibrate steigerten nach 36 h das Glukose-Laktat-Ratio. Am signifikantesten zeigte eine Inkubation mit Fenofibrat eine Steigerung auf 107,2 % des Kontrollwertes. Ähnlich reagierten die Zellen auf eine Exposition mit Clofibrat (104,1 %) und Bezafibrat (107,5 %). Interessanterweise konnte die zelluläre ATP-Konzentration durch Bezafibrat hoch

signifikant auf 129,2 % des Kontrollewertes gesteigert werden. Auch Clofibrat zeigte eine tendenzielle Steigerung des ATP-Gehalt auf 108,1 %.

Im Vergleich zu der ersten Versuchsphase konnte diesmal kein ATP-Abfall bei Fenofibrat-Exposition festgestellt werden (102,4 %).

Zusammenfassend konnten die Resultate der ersten Phase auch nach mehrfachen Wiederholungen und Testungen reproduziert werden. Fibrinsäurederivate scheinen *in vitro* die intrazelluläre ATP-Konzentration zu erhöhen, während das Verhältnis von Glukoseaufnahme zu Laktatabgabe ebenfalls gesteigert wird.

5.2 Wirkungen der identifizierten Substanzen auf den Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

Diese Ergebnisse als Grundlage dienend, wurden von sämtlich untersuchten Screening-Substanzen die Gruppe der Fibrinsäurederivate für eine nähere Betrachtung anhand des Modellorganismus *C. elegans* ausgewählt. Um einer möglichen spezifischen Wirkungsweise auf den Grund zu gehen, wurde der selektive PPAR α -Agonist GW 7647 in die Untersuchungen eingeschlossen.

5.2.1 Wirkungen im N2 Wildtyp

Zunächst musste untersucht werden, ob die ausgewählten Substanzen entsprechend der Fragestellung nach Verlängerung der Lebenserwartung einen solchen Einfluss auf den Organismus *C. elegans* besitzt. Nicht nur die Anzahl an Tage der ältesten Würmer wurde dargestellt, sondern auch die Anzahl an Lebenstagen, an denen noch 50 % der entsprechenden Wurmpopulation lebt (mittlere Lebensspanne).

Da nicht von einer gleichen Empfindlichkeit der Nematoden auf die Pharmakaexposition wie für die untersuchten Zellen auszugehen ist, wurden zuallererst drei verschiedene Konzentrationen entsprechend des erwarteten Wirkungsbereichs unterhalb der Konzentration für die Zellkultur ausgewählt: 10 μM , 1 μM sowie 0,1 μM .

Mit diesen Konzentrationen wurden nun Wurmpopulationen von mindestens 130 Tieren mit einer Einfachbestimmung getestet. Hierunter konnten sämtliche Substanzen eine deutliche Verlängerung der Lebensspanne zeigen. Wie aus Abb. 11 zu entnehmen ist, können alle untersuchten Fibrinsäurederivate bei einer Konzentration von 10 μM hochsignifikante Wirkungen erzielen.

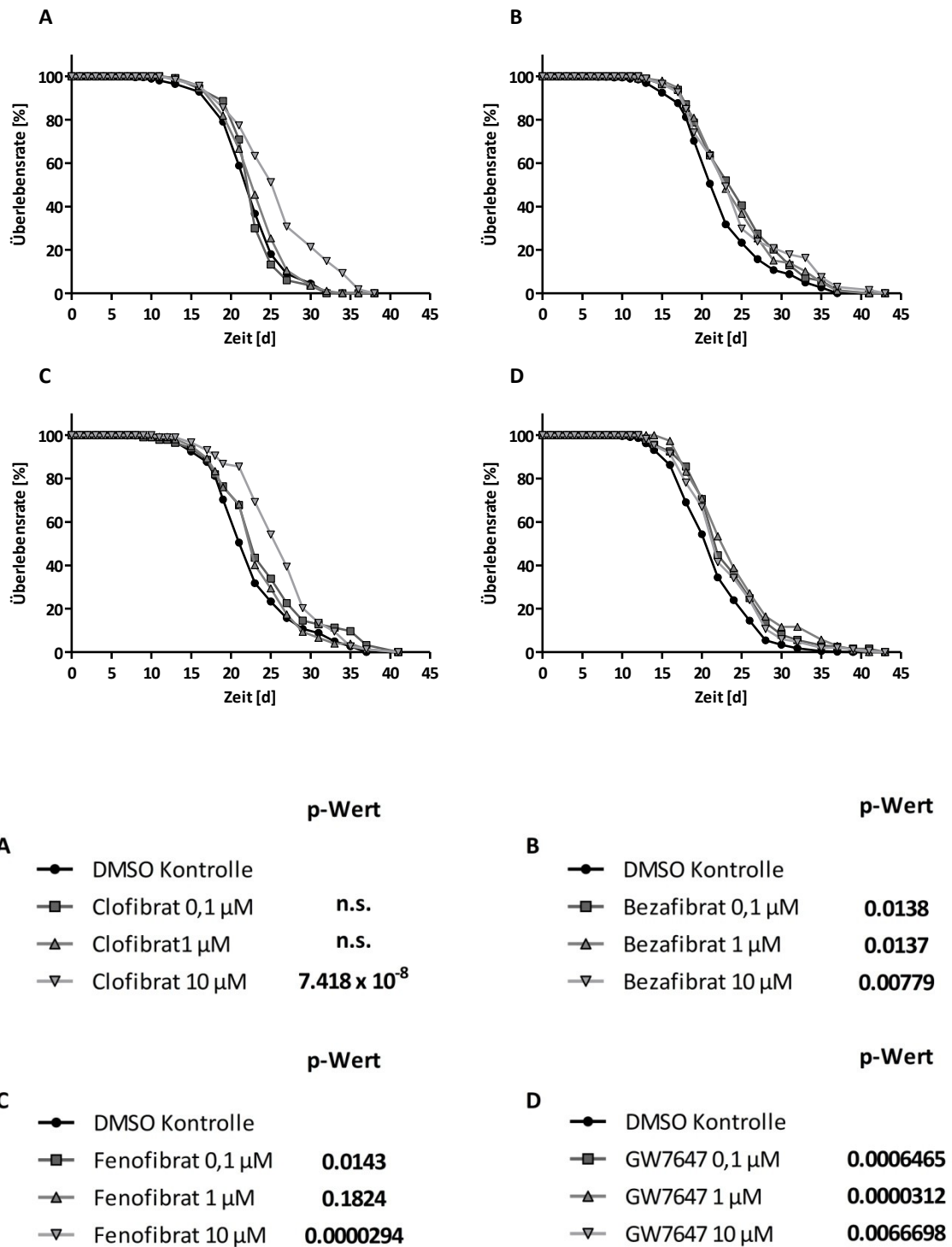


Abb. 11: Effekte der untersuchten Substanzen auf die Überlebenskurven im Lifespan-Experiment mit dazugehörigen Signifikanzwerten. Bedingungen: N2 Wildtyp, n = 1, hitzeinaktivierte OP50.

Hierbei konnte insbesondere unter Exposition gegenüber Clofibrat eine hochsignifikante Steigerung der gemessenen Lebensspanne gegenüber der Kontrolle (DMSO) von $21,6 \pm 1,2$ Tagen (DMSO) auf 25,1 Tage beobachtet werden. Ebenso konnte bei Fenofibrat eine hoch signifikante Steigerung auf 25,6 Tage sowie bei Bezafibrat deutlich signifikant auf 22,9 Tage, jeweils mit 10 μ M Substanzkonzentration festgestellt werden.

Interessanterweise konnte die Substanz GW7647 die Ergebnisse reproduzieren, wenngleich in sämtlichen Konzentrationen, allen voran 1 μ M, mit höchst signifikanten Ergebnissen.

Auch in Bezug auf die älteste erreichte Lebensdauer eines Wurmes, konnte in allen GW7647 exponierten Populationen Würmer mit einer Lebensdauer von bis zu 41 Tagen ($33,1 + 2,6$ Tage in der Kontrollgruppe) beobachtet werden.

Tabelle 5: Zusammenfassung der individuellen Lifespan-Ergebnisse und statistische Analyse mit allen zugehörigen Stämmen und Behandlungen, n = 1, * p ≤ 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Stamm	Behandlung	maximale Überlebensdauer ± SD	mittlere Überlebensdauer ± SD	n	p-Wert vs. DMSO Kontrolle	
N2	0.1 % DMSO Kontrolle	33.1 ± 2.6	21.6 ± 1.2	11		
	Clofibrat 0.1 µM	30.0	22.0	1	n. s.	0.8248
	Clofibrat 1 µM	32.0	22.6	1	n. s.	0.1877
	Clofibrat 10 µM	36.0	25.1	1	***	< 0.0001
	Bezafibrat 0.1 µM	37.0	23.3	1	*	0.0138
	Bezafibrat 1 µM	37.0	22.8	1	*	0.0137
	Bezafibrat 10 µM	41.0	22.9	1	**	0.0078
	Fenofibrat 0.1 µM	37.0	22.5	1	*	0.0143
	Fenofibrat 1 µM	37.0	22.3	1	n. s.	0.1824
	Fenofibrat 10 µM	37.0	25.6	1	***	< 0.0001
	GW7647 0.1 µM	41.0	21.6	1	***	0.0006
	GW7647 1 µM	41.0	22.5	1	***	< 0.0001
	GW7647 10 µM	41.0	21.3	1	**	0.0067

Von den vier untersuchten Substanzen wurden die jeweils wirksamsten Konzentrationen ausgewählt. Mit diesen wurde nun versucht, anhand unabhängiger identischer Versuche mit je 3 Durchgängen, die Ergebnisse zu bestätigen. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 zusammengefasst.

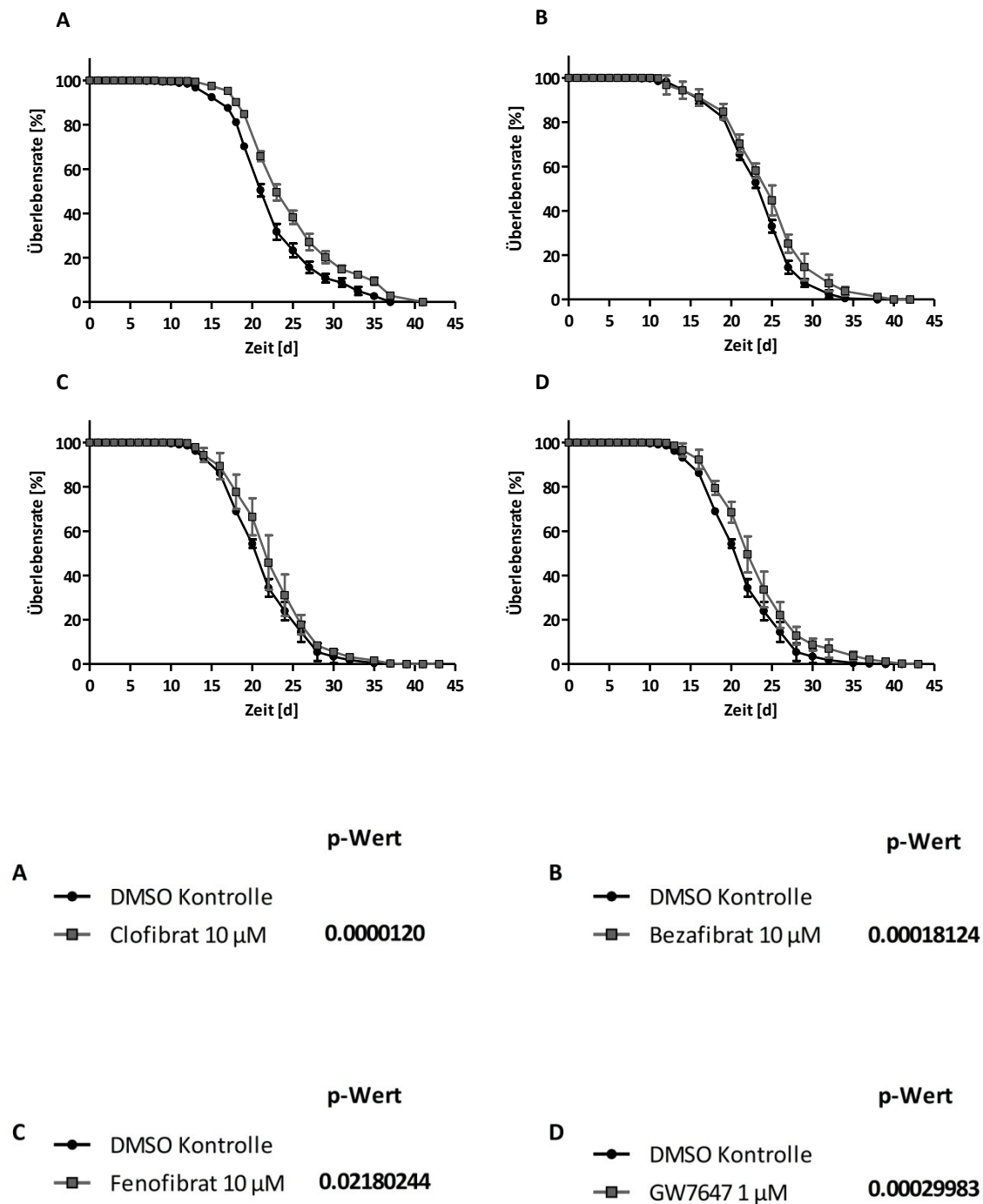


Abb. 12: Effekte der untersuchten Substanzen auf die Überlebenskurven im Lifespan-Experiment mit dazugehörigem Signifikanzwert. Bedingungen: N2 Wildtyp, n = 3, hitzeinaktivierte OP50.

Unter Exposition gegenüber sämtlicher untersuchter Fibrat gelang es, die Lebensspanne der Wurmpopulationen signifikant zu verlängern. Unter Clofibrat konnte die mittlere Lebensspanne von 21,6 Tagen (Kontrolle) auf 23 Tage verlängert, sowie der älteste noch lebende Wurm nach 37 Tagen (33,1 Tage Kontrolle) beobachtet werden. Ebenso zeigte Bezafibrat eine hoch signifikante Verlängerung der Lebensspanne, wobei nach 24,4 Tagen noch 50 % der Wurmpopulation lebte. Der älteste Wurm konnte im Mittel noch nach 36,7 Tagen untersucht werden. Auch unter Fenofibrat-Exposition konnte eine signifikante Lebensverlängerung verifiziert werden.

Denselben Effekt konnten auch die Wurmpopulationen unter Einfluss von GW7647 zeigen. Während die mittlere Lebensdauer hochsignifikant auf 22,1 Tage gesteigert werden konnte, gelang es noch nach 39,7 Tagen die ältesten Würmer zu beobachten.

Tabelle 6: Zusammenfassung der individuellen Lifespan-Ergebnisse mit statistischer Analyse mit allen zugehörigen Stämmen und Behandlungen, n = 3, * $p \leq 0,05$, *** $p < 0,001$.

Stamm	Behandlung	maximale Überlebensdauer \pm SD			mittlere Überlebensdauer \pm SD			n	p-Wert vs. DMSO Kontrolle	
N2	0.1 % DMSO Kontrolle	33.1	\pm	2.6	21.6	\pm	1.2	11		
	Clofibrat 10 μ M	37.0	\pm	0.0	23.0	\pm	0.5	3	***	< 0.0001
	Bezafibrat 10 μ M	36.7	\pm	2.3	24.4	\pm	0.7	3	***	0.0002
	Fenofibrat 10 μ M	35.7	\pm	1.2	21.7	\pm	1.1	3	*	0.0218
	GW7647 1 μ M	39.7	\pm	1.2	22.1	\pm	0.8	3	***	0.0003

5.2.2 Wirkungen in der *nhr-49* Mutante

Da nach dem bisherigen Kenntnisstand sowohl eine substanzspezifische als auch klassenspezifische Wirkung der Fibrate nicht auszuschließen ist, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, explizit die PPAR α – agonistische Wirkung auf die Lebensdauer von *C. elegans* zu untersuchen.

Hierzu wurde ein exakt identischer Versuchsaufbau, jedoch anstelle von N2-Wildtypwürmern, mit *nhr-49*-Mutanten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 illustriert.

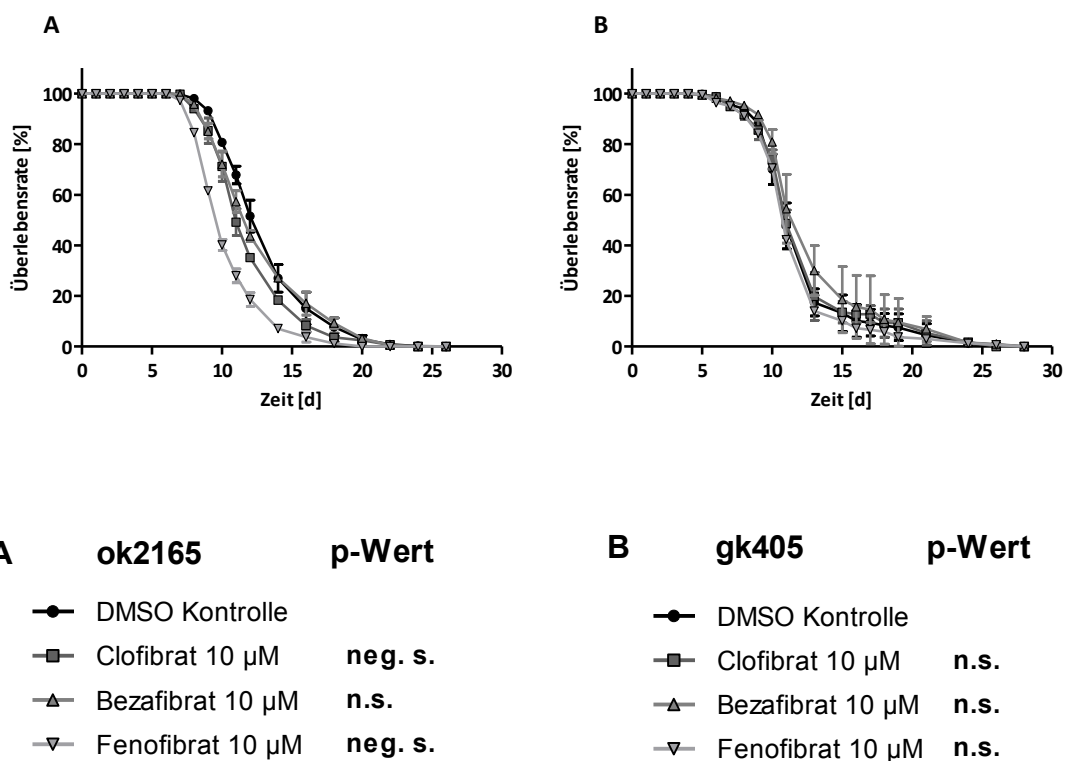


Abb. 13: Effekte der untersuchten Substanzen auf die Überlebenskurven im Lifespan-Experiment mit dazugehörigem Signifikanzwert. Bedingungen: *nhr-49/gk405* bzw. *ok2165*, $n = 3$, hitzeinaktivierte OP50.

Beide verfügbaren *nhr-49*-Stämme konnten keine Verlängerung der Lebensspanne der jeweiligen Wurmpopulationen bewirken.

Wie in der Abbildung ersichtlich, zeigte sich sowohl bei Clofibrat- als auch Fenofibrat-Exposition eine signifikante Verkürzung der Lebensspanne des *nhr-49/ok2165*-Stammes auf 11,0 bzw. 9,5 Tage im Mittel. Auch unter Einfluss von Bezafibrat sank die mittlere Überlebensdauer auf 11,5 Tage. Weder in der Kontroll-, noch in den Substanzgruppen konnte ein *nhr-49/ok2165* Wurm länger als 22 Tage leben.

Ebenfalls ein lebensverkürzender Effekt zeigte sich im *nhr-49/gk405* Wurm unter Exposition von Clofibrat und Fenofibrat auf 11,0 / 10,8 Tage im Mittel bzw. 22,3 / 22,0 Tage der maximalen Lebensspanne.

Tabelle 7: Zusammenfassung der individuellen Lifespan-Ergebnisse mit statistischer Analyse mit allen zugehörigen Stämmen und Behandlungen, n = 3.

Stamm	Behandlung	maximale Überlebensdauer ± SD			mittlere Überlebensdauer ± SD			n	p-Wert vs. DMSO Kontrolle	
<hr/>										
<i>nhr-49</i>										
<i>ok2165</i>	0.1 % DMSO Kontrolle	22.0	±	2.0	12.2	±	0.4	3		
	Clofibrat 10 µM	22.0	±	0.0	11.0	±	0.2	3	neg. s.	< 0.0001
	Bezafibrat 10 µM	21.3	±	1.2	11.5	±	0.2	3	n. s.	0.1606
	Fenofibrat 10 µM	18.0	±	0.0	9.5	±	0.0	3	neg. s.	< 0.0001
<i>gk405</i>	0.1 % DMSO Kontrolle	23.7	±	2.5	11.0	±	0.4	3		
	Clofibrat 10 µM	22.3	±	2.9	11.0	±	0.3	3	n. s.	0.8962
	Bezafibrat 10 µM	24.3	±	2.9	11.4	±	0.8	3	n. s.	0.0679
	Fenofibrat 10 µM	22.0	±	3.6	10.8	±	0.2	3	n. s.	0.3035

6 Diskussion

Seit längerem sind unterschiedliche Faktoren bekannt, welche die Lebenserwartung in vielen verschiedenen Lebewesen beeinflussen können. Durch neuere Untersuchungen wird gerade der Energiestoffwechsel als wichtige Schlüsselposition zur Einflussnahme gesehen.

Lange Zeit existierte die vorherrschende Meinung, dass eine erhöhte metabolische Rate durch die damit assoziierte Steigerung des mitochondrialen Metabolismus und ROS-Bildung zu Zellschäden und im Verlauf zur einer progredienten Seneszenz führt (Wallace 2005). Populäre Beispiele sind die „Rate of Living“- Hypothese oder auch die „Mitochondrial Theory of Aging“ (Harman 1956, Harman 1972).

Jedoch wird dieser postulierte Zusammenhang aufgrund gegensätzlicher Untersuchungen und Erkenntnisse zunehmend in Frage gestellt. Es gibt Hinweise darauf, dass milde Stressoren (z.B. Kalorienrestriktion) durch Modulation mitochondrialer Stoffwechselwege, beispielsweise die Atmungskette, eine vermehrte ROS-Bildung provozieren, was wiederum in einer positiven Stressantwort die Lebenserwartung steigern kann (Houthoofd et al. 2003, Johnson et al. 2002, Zarse et al. 2007). Im Gegensatz dazu kann eine kalorienreiche Ernährung zu einer Abnahme der Lebensspanne führen (Schulz et al. 2007). Weiterhin fehlen bisher Daten, die eine lebensverlängerte Wirkung von Antioxidantien beschreiben (Bjelakovic et al. 2007).

Unter diesem Gesichtspunkt gilt es, Substanzen und Stoffwechselwege zu finden, die durch eine mögliche Steigerung des oxidativen Stoffwechsels eine lebensverlängernde Wirkung im Modellorganismus *C. elegans* induzieren können.

Um aus der Vielzahl vorhandener Stoffe wie Pharmaka oder Naturstoffe potente Substanzen herauszufinden, sollte zuerst anhand eines Screenings, basierend auf Zellkultur eine engere Auswahl getroffen werden. Eine wichtige Bedeutung hatte dabei die Auswahl der untersuchten Zellfunktionen, die einen solchen positiven Einfluss auf den mitochondrialen Stoffwechsel mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität darstellen

können. Hierbei fiel die Entscheidung auf die genauere Untersuchung von zellulärem ATP-Gehalt in Verbindung mit Glukoseaufnahme und Laktatabgabe. Sollte im Vergleich zur Kontrolle nach einer gewissen Zeit der intrazelluläre ATP-Gehalt gestiegen sein, so kann dies in Verbindung mit einer gesteigerten Glukoseaufnahme und gesenkter Laktatproduktion (erhöhter GLR) für eine gesteigerte aerobe Energiegewinnung und damit für eine Induktion des oxidativen Stoffwechsels sprechen. Um eine Beeinflussung der Messung durch eine unterschiedliche Zellzahl und Zellgröße zu vermeiden, wurden alle Ergebnisse auf den zellulären Proteingehalt normiert.

In der hier vorliegenden Arbeit gelang es, durch das dargestellte Screening-Verfahren auf Basis von Hep G2-Zellen, verschiedene Substanzen nachzuweisen, welche durch Erhöhung der ATP-Konzentration und Erhöhung des GLR für eine nähere Untersuchung in einem komplexeren Versuchsmodell sprechen.

Insbesondere die Substanzgruppe der Fibrate zeigte weitestgehend positive Effekte. So kam es sowohl nach 24 h als auch 48 h Inkubation zu einem Anstieg des GLR. Allerdings konnten in dieser ersten Phase der Screening-Untersuchung keine deutliche Steigerung des zellulären ATP-Gehalts festgestellt werden. Während in der zweiten Phase des Experiments die positiven Effekte auf den GLR durch Fibrat-Exposition bestätigt wurden, kam es im Gegensatz zur ersten Phase zu einem deutlichen Anstieg der zellulären ATP-Produktion bei zwei unterschiedlichen Durchgängen nach jeweils 36 h (Bezafibrat 100 µM: 129,2 %, Clofibrat 100 µM: 108,1 %, Fenofibrat 100 µM: 102,4 %).

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch das Einwirken von Fibraten auf Hep G2-Zellen die zelluläre ATP-Konzentration gesteigert wird, während das Verhältnis von verbrauchter Glukose zu produziertem Laktat sinkt. Dies lässt vermuten, dass über den Zeitraum von 24 h, 36 h und 48 h eine gesteigerte aerobe Glykolyse zu einer Erhöhung der ATP-Konzentration und letztlich gesteigerter oxidativer Metabolisierung geführt haben kann.

Die erzielten experimentellen Ergebnisse spiegeln die geäußerte Annahme über eine modulatorische Wirkung von Fibrate auf den mitochondrialen Stoffwechsel wieder (Minnich et al. 2001).

Es ist möglich, dass die gesteigerte zelluläre Glukoseaufnahme über eine erhöhte Insulinsensitivität vermittelt werden kann. Verschiedene Studien konnten sowohl am Rattenmodell, als auch am Menschen eine Fibrat-vermittelte gesteigerte Gukosetoleranz nachweisen (Jones et al. 1990, Matsui et al. 1997, Inoue et al. 1994, Furuhashi et al. 2002). Eine weitere Studie wies eine Steigerung der Insulin-Sensitivität einhergehend mit der Steigerung der mitochondrialen Aktivität bei Kindern mit Brandverletzungen durch Therapie mit Fenofibrat nach (Cree et al. 2007).

Für die Bewertung der unterschiedlichen Ergebnisse der ATP-Konzentrationen beider Testphasen ist zunächst die unterschiedliche Inkubationsdauer zu beachten, die einen direkten Vergleich der Ergebnisse nicht möglich macht. Neben der Inkubationszeit können verschiedene weitere Faktoren zu dieser Diskrepanz geführt haben. So findet in der ersten Screening-Phase die Untersuchung mit einer dreifach-Bestimmung statt. Dies kann eine erhöhte Einflussnahme von Zufalls- oder Messfehlern bewirken. Weiterhin besteht bei dieser Art von Screening durch die Zusammenlegung mehrfacher Testungen auf ein System (96-Well-Mikrotiterplatte) ein höheres Risiko für systematische Fehler. Bereits durch eine nicht erkannte Kontamination der Zellen oder auch zufällig aufgetretene Fehler in den darauffolgenden biochemischen Verfahren kann dies auftreten und somit zu einer Verminderung der Sensitivität und Spezifität des Screeningverfahrens führen.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob das Screening auf Grundlage einer Hepatom-Zelllinie die physiologischen Auswirkungen auf Stoffwechselwege exakt simulieren kann. Durch die Immortalisierung der Hepatozyten können verschiedene zellspezifische Funktionen verlorengehen. Daneben besteht aufgrund der hohen Proliferationsrate der Zelllinie eine genetische Instabilität, was zu weiteren Mutationen und Phänotyp-Veränderungen führen kann (Freshney 1990). Ungeachtet dessen konnte nachgewiesen werden, dass die Mehrzahl an leberspezifischen Enzymen exprimiert wird und letztendlich die humane Abstammung das Verwenden im Rahmen dieses Screenings anbietet (Doostar et al. 1990, Knowles et al. 1980).

Entsprechend der aufgestellten Arbeitshypothese:

- > *Die Etablierung eines Screeningverfahrens in vitro, basierend auf Indikatoren des oxidativen Stoffwechsels, ermöglicht die Identifikation spezifischer Effektoren (Wirkstoffe), welche hinweisend im Modellorganismus C. elegans zu einer verlängerten Lebensspanne führen. Eine Erhöhung der zellulären ATP-Konzentration und des Verhältnisses von Glukoseaufnahme zu Laktatabgabe sind hinreichende Eigenschaften hierzu.* <

wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die Gruppe der Fibrinsäurederivate für die Untersuchung im Organismus *C. elegans* ausgewählt.

Bis dato existierten keine Informationen über die Einflussnahme einer Fibrat-Exposition auf die Lebensdauer von *C. elegans*.

Für die Planung des weiteren Versuchsaufbaus wurde spekuliert, ob Fibrinsäurederivate gruppenspezifisch über eine Aktivierung von PPAR α ihre Wirkung vermitteln. Daher wurde der hoch selektive PPAR α - Agonist GW7647 (Brown et al. 2001) ergänzend in die folgenden Untersuchungen aufgenommen.

Weiterhin konnte eine zweite Arbeitshypothese erarbeitet werden:

- > *Fibrinsäurederivate vermitteln klassenspezifisch via Aktivierung des PPAR alpha eine Lebensverlängerung im Modellorganismus C. elegans.* <

Interessanterweise stellte sich bereits nach den ersten Versuchsdurchläufen heraus, dass alle drei, im Screening aufgefallenen Fibrate deutlich das Leben des *C. elegans* Wildtyps

verlängern. Auffällig war hierbei, dass die Konzentrationshöhe proportional mit der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Lebensverlängerung erschien.

Nach Überprüfung der Ergebnisse durch mehrere unabhängige Versuchsdurchläufe mit der jeweils potentesten Konzentration, konnten die Resultate bestätigt werden. Es kam zu einer Verlängerung der mittleren und maximalen Lebensspanne. In der Konzentration von 10 μ M zeigten sowohl Clofibrat ($p < 0,0001$), als auch Bezafibrat ($p = 0,0002$) hochsignifikante Ergebnisse. Auch Fenofibrat in der Konzentration von 10 μ M war in der Lage, das Leben von *C. elegans* signifikant zu verlängern ($p = 0,0218$).

Somit konnte deutlich die erste Hypothese bestätigt werden. Mithilfe des zellkulturbasierenden Screenings war es möglich, Substanzen zu identifizieren, welche im Nematoden *C. elegans* zu einer Verlängerung der Lebensspanne führen.

Auch Im weiterführenden Lifespan-Experiment gelang durch den Einsatz von GW7647 ebenfalls eine hochsignifikante Lebensverlängerung der untersuchten Wurmpopulationen in sämtlich untersuchten Substanzkonzentrationen. In der Konzentration von 1 μ M war auch in drei unabhängig voneinander durchgeführten Untersuchungen die Signifikanz überdurchschnittlich erhöht ($p = 0,0003$).

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass durch die drei ausgewählten Fibrinsäurederivate stellvertretend, eine Substanzgruppen-spezifische Modulation der Lebenserwartung im Wildtyp-Wurm hervorgerufen wird. Ebenso lassen die Ergebnisse von GW7647 eine PPAR α - agonistisch vermittelte lebensverlängernde Wirkung vermuten.

Um auch diesen Zusammenhang zu bekräftigen, wurden die Lifespan-Experimente um die verfügbaren PPAR α - Homologe *nhr-49* defizienten Mutanten, Stämme *ok2165* sowie *gk405*, erweitert.

Bei diesen Wurmpopulationen wurden sämtliche zuvor erreichte lebensverlängernde Effekte durch Fibrate aufgehoben. Der Stamm *nhr-49/ ok2165* reagierte auf den Einfluss von Clofibrat und Fenofibrat gar mit einer signifikanten Lebensverkürzung.

Dies spiegelt die zweite Arbeitshypothese, dass über eine klassenspezifische Modulation des PPAR α - Homolog eine deutlich verlängerte Lebenserwartung induziert wird.

Schlussfolgernd gelang es im Laufe dieser Arbeit die zugrundeliegenden Fragestellungen erfolgreich zu beantworten.

Anhand der vorrausgegangenen Screening-Methode gelang die Identifizierung einer Substanzgruppe nach den gestellten Parametern zur Untersuchung des mitochondrialen Metabolismus.

Dieser Zusammenhang bestätigt die Annahme, dass durch Erhöhung der zellulären ATP-Konzentration bei gleichzeitiger Erhöhung des Verhältnisses von Glukoseaufnahme zu Laktatabgabe der Stoffwechsel derart moduliert wird, dass eine lebensverlängernde Wirkung in *C. elegans* hervorgerufen werden kann.

Sämtliche der in dieser Arbeit aufgeführten Fibrinsäurederivate konnten im Modellorganismus *C. elegans* eine deutlich signifikante Lebensverlängerung erzielen.

Weiterhin zeigte sich, dass durch eine selektive Aktivierung des PPAR α homologen Signalweges durch GW7647 ein ebensolcher Effekt resultiert. Diese Fibrat-vermittelte Wirkung ist im *nhr-49* defizientem Wurm aufgehoben.

Demzufolge wird spezifisch durch Fibrinsäurederivate der *C. elegans* homologe *nhr-49* aktiviert. Über diese Induktion des PPAR α entsprechenden Signalweges wird eine lebensverlängernde Wirkung induziert.

Eine nachfolgende Erklärung dieser neu entdeckten positiven Modulation der Lebensspanne von *C. elegans* durch Fibrate kann lediglich anhand von Hypothesen gegeben werden und sollte Ziel nachfolgender Untersuchungen sein. Dabei ist der bereits diskutierte Zusammenhang mit einer nachfolgenden Aktivierung von AMPK näher zu untersuchen. Wie bereits beschrieben, kommt es durch Aktivierung von PPAR α nachfolgend zur Aktivierung von AMPK. Es ist bereits dazu bekannt, dass eine Induktion des *C. elegans* Homolog der AMPK Untereinheit α , AAK-2, zu einer Lebensverlängerung

u.a. durch nachfolgende Aktivierung des Insulin/IGF-1- Signalweges führt (Apfeld et al. 2004).

Neben der Aktivierung von AMPK sollte auch die weitere Einflussnahme über AMPK-unabhängige Signalwege diskutiert werden.

Letztendlich stellt sich die Frage, inwieweit die in dieser Arbeit dargestellten Erkenntnisse über die Modulation der Lebenserwartung im Modellorganismus *C. elegans* auch auf den humanen Metabolismus übertragbar sind.

Da eine Aktivierung von AMPK Im Tierversuch mit Nagetieren zu einer Lebensverlängerung von über 20 % führte (Anisimov et al. 2003, Dilman und Anisimov 1980), ist anzunehmen, dass der lebensverlängernde Einfluss von Fibraten in *C. elegans* auch auf Säugetiere übertragbar ist.

Eine Verlängerung der mittleren Lebenserwartung von *C. elegans* bis zu 4 Tage auf ca. 25 Tage, wie hier unter Fibratexposition beschrieben, entspräche hochgerechnet auf die menschliche Lebenserwartung, ca. 15,2 zusätzliche Jahre bei einer durchschnittlichen mittleren Lebenserwartung von 80 Jahren.

Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die pharmakologische Modulation des Stoffwechsels eine lebensverlängernde Wirkung im Nematoden *C. elegans* erzielt werden kann. Insbesondere Fibrinsäurederivate bleiben auch knapp ein halbes Jahrhundert nach ihrer Entdeckung weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Neben der bereits bekannten positiven Beeinflussung des Lipidstoffwechsels, weshalb ihnen auch eine pharmakotherapeutische Funktion zugesprochen wird, werden eine Reihe weiterer Eigenschaften, über die Aktivierung des mitochondrialen Stoffwechsels bis hin zur lebensverlängernden Wirkung im Modellorganismus *C. elegans* das Interesse an dieser Substanzgruppe weiter ausbauen.

7 Schlussfolgerungen

Im Rahmen der beschriebenen Arbeit gelang die erfolgreiche Etablierung eines Screening Verfahrens auf Zellkultur-Basis zur Identifizierung von Substanzen, welche den oxidativen Metabolismus induzieren können. Dies stellt einen wesentlichen Beitrag in Hinblick auf der Suche nach Möglichkeiten zur Modulation des mitochondrialen Stoffwechsels und einer damit verbundenen lebensverlängernden Wirkung in verschiedenen Spezies dar.

Die Steigerung des zellulären ATP-Gehalts, bei ebenso gesteigertem Verhältnis von aufgenommener Glukose zu abgegebenem Laktat, erscheinen hinreichende prädiktive Eigenschaften hierfür zu sein.

Fibrinsäurederivate zeigen neben dieser beschriebenen Eigenschaft zur Modulation des mitochondrialen Metabolismus, klassenspezifisch eine signifikante Lebensverlängerung im Modellorganismus *C. elegans*. Da dieser Effekt bei fehlender PPAR α -Expression aufgehoben oder vielmehr umgekehrt wird, ist eine lebensverlängernde Wirkung durch Aktivierung des PPAR α -Signalweges ersichtlich.

Mit den vorliegenden Ergebnissen kann zum ersten Mal ein direkter lebensverlängernder Effekt durch eine Fibrat-vermittelte Modulation des PPAR α -Signalweges im Modellorganismus *C. elegans* beschrieben werden. Es ist ersichtlich, dass dieser Effekt klassenspezifisch vermittelt wird.

Ob sich diese Ergebnisse auch auf andere Spezies, einschließlich des Menschen übertragen lassen, sollte neben der Erforschung hiermit assoziierter Signaltransduktionswege, Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

1988. Central determinants of age-related declines in motor function. *Ann N Y Acad Sci*, 515:1-430.
- Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, Devchand P, Francis S, Kadakia M, Kanda T, Orasanu G, Sharlach M, Zandbergen F, Plutzky J. 2007. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J Intern Med*, 262 (2):184-198.
- Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR. 2006. LKB1-dependent signaling pathways. *Annu Rev Biochem*, 75:137-163.
- Altun ZFaH, D.H Introduction <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/IMAGES/introfig1.jpg>.
- Anisimov VN, Semenchenko AV, Yashin AI. 2003. Insulin and longevity: antidiabetic biguanides as geroprotectors. *Biogerontology*, 4 (5):297-307.
- Anonymous. 1975. Clofibrate and niacin in coronary heart disease. *JAMA*, 231 (4):360-381.
- Anonymous. 1978. A co-operative trial in the primary prevention of ischaemic heart disease using clofibrate. Report from the Committee of Principal Investigators. *Br Heart J*, 40 (10):1069-1118.
- Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, DiStefano PS, Curtis R. 2004. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev*, 18 (24):3004-3009.
- Arzneimittel C. 2011a. Fachinformation Bezafibrat-CT 200mg Filmtabletten. Rote Liste,
- Arzneimittel C. 2011b. Fachinformation Fenofibrat-CT 100mg Hartkapseln. Rote Liste,
- atcc HEPG2 [http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription /tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HB-8065&Template=cellBiology](http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HB-8065&Template=cellBiology).
- ATCC HEP G2 Product Description
- Backes JM, Gibson CA, Ruisinger JF, Moriarty PM. 2007. Fibrates: what have we learned in the past 40 years? *Pharmacotherapy*, 27 (3):412-424.
- Backman JT, Kyrklund C, Neuvonen M, Neuvonen PJ. 2002. Gemfibrozil greatly increases plasma concentrations of cerivastatin. *Clin Pharmacol Ther*, 72 (6):685-691.
- Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giral M. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem*, 276 (2):1486-1493.
- Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, Staels B. 2002. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22 (5):717-726.
- Baudisch A. 2005. Hamilton's indicators of the force of selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (23):8263-8268.
- Beg ZH, Allmann DW, Gibson DM. 1973. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun*, 54 (4):1362-1369.
- Bergmeyer HU, Bernt E. 1974. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2ndte Aufl. New York: Academic Press.
- Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. 2007. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 297 (8):842-857.

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77 (1):71-94.
- Brown PJ, Stuart LW, Hurley KP, Lewis MC, Winegar DA, Wilson JG, Wilkison WO, Ittoop OR, Willson TM. 2001. Identification of a subtype selective human PPAR α agonist through parallel-array synthesis. *Bioorg Med Chem Lett*, 11 (9):1225-1227.
- Brun S, Carmona MC, Mampel T, Vinas O, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F. 1999. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor- α induce the expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle: a potential mechanism for the lipid intake-dependent activation of uncoupling protein-3 gene expression at birth. *Diabetes*, 48 (6):1217-1222.
- Byerly L, Cassada RC, Russell RL. 1976. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev Biol*, 51 (1):23-33.
- Calabrese EJ, Baldwin LA. 2002. Defining hormesis. *Hum Exp Toxicol*, 21 (2):91-97.
- Carling D, Clarke PR, Zammit VA, Hardie DG. 1989. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem*, 186 (1-2):129-136.
- Carlson CA, Kim KH. 1973. Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem*, 248 (1):378-380.
- Cassada RC, Russell RL. 1975. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 46 (2):326-342.
- Chanda D, Lee CH, Kim YH, Noh JR, Kim DK, Park JH, Hwang JH, Lee MR, Jeong KH, Lee IK, Kweon GR, Shong M, Oh GT, Chiang JY, Choi HS. 2009. Fenofibrate differentially regulates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression via adenosine monophosphate-activated protein kinase-dependent induction of orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *Hepatology*, 50 (3):880-892.
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. 2009. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 325 (5937):201-204.
- Cree MG, Zwetsloot JJ, Herndon DN, Qian T, Morio B, Fram R, Sanford AP, Aarsland A, Wolfe RR. 2007. Insulin sensitivity and mitochondrial function are improved in children with burn injury during a randomized controlled trial of fenofibrate. *Ann Surg*, 245 (2):214-221.
- Darlington GJ, Kelly JH, Buffone GJ. 1987. Growth and hepatospecific gene expression of human hepatoma cells in a defined medium. *In Vitro Cell Dev Biol*, 23 (5):349-354.
- Davidson MH. 2002. Controversy surrounding the safety of cerivastatin. *Expert Opin Drug Saf*, 1 (3):207-212.
- Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, Staels B. 2000. Induction of δ - α expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor- α activators. *J Biol Chem*, 275 (47):36703-36707.
- Dilman VM, Anisimov VN. 1980. Effect of treatment with phenformin, diphenylhydantoin or L-dopa on life span and tumour incidence in C3H/3Sn mice. *Gerontology*, 26 (5):241-246.
- Doostar H, Demoz A, Burke MD, Melvin WT, Grant MH. 1990. Variation in drug-metabolising enzyme activities during the growth of human Hep G2 hepatoma cells. *Xenobiotica*, 20:435-441.
- Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. 1992. Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, 68 (5):879-887.
- Dudley NR, Goldstein B. 2005. RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Mol Biol*, 309:29-38.

- Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. 2006. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res*, 45 (2):120-159.
- Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408 (6809):239-247.
- Forman BM, Chen J, Evans RM. 1997. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (9):4312-4317.
- Freshney IR. 1990. Tierische Zellkulturen: ein Methoden-Handbuch. Aufl. Berlin New York: Walter de Greyter.
- Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V, et al. 1987. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med*, 317 (20):1237-1245.
- Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. 2002. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem*, 277 (28):25226-25232.
- Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D. 2003. Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature*, 425 (6953):90-93.
- Furuhashi M, Ura N, Murakami H, Hyakukoku M, Yamaguchi K, Higashiura K, Shimamoto K. 2002. Fenofibrate improves insulin sensitivity in connection with intramuscular lipid content, muscle fatty acid-binding protein, and beta-oxidation in skeletal muscle. *J Endocrinol*, 174 (2):321-329.
- Gervois P, Torra IP, Fruchart JC, Staels B. 2000. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin Chem Lab Med*, 38 (1):3-11.
- Gervois P, Kleemann R, Pilon A, Percevault F, Koenig W, Staels B, Kooistra T. 2004. Global suppression of IL-6-induced acute phase response gene expression after chronic in vivo treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate. *J Biol Chem*, 279 (16):16154-16160.
- Gervois P, Chopin-Delannoy S, Fadel A, Dubois G, Kosykh V, Fruchart JC, Najib J, Laudet V, Staels B. 1999. Fibrates increase human REV-ERBalpha expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol Endocrinol*, 13 (3):400-409.
- Ginsberg HN, Elam MB, Lovato LC, Crouse JR, 3rd, Leiter LA, Linz P, Friedewald WT, Buse JB, Gerstein HC, Probstfield J, Grimm RH, Ismail-Beigi F, Bigger JT, Goff DC, Jr., Cushman WC, Simons-Morton DG, Byington RP. 2010. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 362 (17):1563-1574.
- Group TBS. 2000. Secondary prevention by raising HDL cholesterol and reducing triglycerides in patients with coronary artery disease: the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study. *Circulation*, 102 (1):21-27.
- Hardie DG, Carling D. 1997. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem*, 246 (2):259-273.
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11 (3):298-300.
- Harman D. 1972. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc*, 20 (4):145-147.
- Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG. 2005. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab*, 2 (1):9-19.

- Houthoofd K, Braeckman BP, Johnson TE, Vanfleteren JR. 2003. Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signalling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*, 38 (9):947-954.
- Hwahng SH, Ki SH, Bae EJ, Kim HE, Kim SG. 2009. Role of adenosine monophosphate-activated protein kinase-p70 ribosomal S6 kinase-1 pathway in repression of liver X receptor- α -dependent lipogenic gene induction and hepatic steatosis by a novel class of dithiolethiones. *Hepatology*, 49 (6):1913-1925.
- Ingram DK, Anson RM, de Cabo R, Mamczarz J, Zhu M, Mattison J, Lane MA, Roth GS. 2004. Development of calorie restriction mimetics as a longevity strategy. *Ann N Y Acad Sci*, 1019:412-423.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL. 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115 (5):577-590.
- Inoue I, Takahashi K, Katayama S, Akabane S, Negishi K, Suzuki M, Ishii J, Kawazu S. 1994. Improvement of glucose tolerance by bezafibrate in non-obese patients with hyperlipidemia and impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract*, 25 (3):199-205.
- Issemann I, Green S. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347 (6294):645-650.
- Johnson TE, Henderson S, Murakami S, de Castro E, de Castro SH, Cypser J, Rikke B, Tedesco P, Link C. 2002. Longevity genes in the nematode *Caenorhabditis elegans* also mediate increased resistance to stress and prevent disease. *J Inherit Metab Dis*, 25 (3):197-206.
- Jones IR, Swai A, Taylor R, Miller M, Laker MF, Alberti KG. 1990. Lowering of plasma glucose concentrations with bezafibrate in patients with moderately controlled NIDDM. *Diabetes Care*, 13 (8):855-863.
- Kaletta T, Hengartner MO. 2006. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov*, 5 (5):387-398.
- Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Scott R, Taskinen MR, Forder P, Pillai A, Davis T, Glasziou P, Drury P, Kesaniemi YA, Sullivan D, Hunt D, Colman P, d'Emden M, Whiting M, Ehnholm C, Laakso M. 2005. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet*, 366 (9500):1849-1861.
- Kirkwood TB. 2005. Understanding the odd science of aging. *Cell*, 120 (4):437-447.
- Knowles BB, Howe CC, Aden DP. 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, 209 (4455):497-499.
- Lage R, Dieguez C, Vidal-Puig A, Lopez M. 2008. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med*, 14 (12):539-549.
- LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao TS, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB, Tomas E. 2006. Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291 (1):E175-181.
- Lee WH, Kim SG. 2010. AMPK-Dependent Metabolic Regulation by PPAR Agonists. *PPAR Res*, 2010
- Liangpunsakul S, Wou SE, Wineinger KD, Zeng Y, Cyganek I, Jayaram HN, Crabb DW. 2009. Effects of WY-14,643 on the phosphorylation and activation of AMP-dependent protein kinase. *Arch Biochem Biophys*, 485 (1):10-15.
- Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res*, 94 (9):1168-1178.
- Matsui H, Okumura K, Kawakami K, Hibino M, Toki Y, Ito T. 1997. Improved insulin sensitivity by bezafibrate in rats: relationship to fatty acid composition of skeletal-muscle triglycerides. *Diabetes*, 46 (3):348-353.

- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244 (22):6049-6055.
- Minnich A, Tian N, Byan L, Bilder G. 2001. A potent PPARalpha agonist stimulates mitochondrial fatty acid beta-oxidation in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280 (2):E270-279.
- Nakatani T, Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Miura S, Ezaki O. 2002. Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. *J Biol Chem*, 277 (11):9562-9569.
- Narkar VA, Downes M, Yu RT, Emblar E, Wang YX, Banayo E, Mihaylova MM, Nelson MC, Zou Y, Juguilon H, Kang H, Shaw RJ, Evans RM. 2008. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell*, 134 (3):405-415.
- NCEP. 2002. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 106 (25):3143-3421.
- Nemoto S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Finkel T. 2000. Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol Cell Biol*, 20 (19):7311-7318.
- Noll F. 1966. Methode zur quantitativen Bestimmung von L(+)-Lactat mittels Lactat-Dehydrogenase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase. *BiochemZ*, 346:41-49.
- Okazaki M, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Nakayama S, Kambayashi M, Hashimoto K, Terada Y. 2010. PPARbeta/delta regulates the human SIRT1 gene transcription via Sp1. *Endocr J*, 57 (5):403-413.
- Olsen A, Vantipalli MC, Lithgow GJ. 2006. Using *Caenorhabditis elegans* as a model for aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 1067:120-128.
- Osler ME, Zierath JR. 2008. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Endocrinology*, 149 (3):935-941.
- Pearl R. 1928. The rate of living. Being an account of some experimental studies on the biology of life duration. New York: Alfred Knopf,
- Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J. 1999. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med*, 341 (6):410-418.
- Rubner M. 1908. Das Wachstumsproblem und die Lebensdauer des Menschen und einiger Säugetiere vom energetischen Standpunkt aus betrachtet. Das Problem der Lebensdauer und seine Beziehungen zum Wachstum und der Ernährung, München und Berlin: R Oldenbourg Verlag:127-208.
- Saha AK, Avilucea PR, Ye JM, Assifi MM, Kraegen EW, Ruderman NB. 2004. Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 314 (2):580-585.
- Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M. 2007. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab*, 6 (4):280-293.
- Sierra ML, Beneton V, Boullay AB, Boyer T, Brewster AG, Donche F, Forest MC, Fouchet MH, Gellibert FJ, Grillot DA, Lambert MH, Laroze A, Le Grumelec C, Linget JM, Montana VG, Nguyen VL, Nicodeme E, Patel V, Penfornis A, Pineau O, Pohin D, Potvain F, Poulain G, Ruault CB, Saunders M, Toum J, Xu HE, Xu RX, Pianetti PM. 2007. Substituted 2-[(4-aminomethyl)phenoxy]-2-methylpropionic acid PPARalpha agonists. 1. Discovery of a novel series of potent HDLc raising agents. *J Med Chem*, 50 (4):685-695.

- Southam C, Ehrlich J. 1943. Effects of extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology*, 33:517-524.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*, 277 (47):44784-44790.
- Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. 1998. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation*, 98 (19):2088-2093.
- Stange J, Mitzner S, Strauss M, Fischer U, Lindemann S, Peters E, Holtz M, Drewelow B, Schmidt R. 1995. Primary or established liver cells for a hybrid liver? Comparison of metabolic features. *ASAIO J*, 41 (3):M310-315.
- Svoboda DJ, Azarnoff DL. 1966. Response of hepatic microbodies to a hypolipidemic agent, ethyl chlorophenoxyisobutyrate (CPIB). *J Cell Biol*, 30 (2):442-450.
- Tenenbaum A, Fisman EZ. 2010. "If it ain't broke, don't fix it": a commentary on the positive-negative results of the ACCORD Lipid study. *Cardiovasc Diabetol*, 9:24.
- Towler MC, Hardie DG. 2007. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res*, 100 (3):328-341.
- Van Gilst MR, Hadjivassiliou H, Yamamoto KR. 2005a. A *Caenorhabditis elegans* nutrient response system partially dependent on nuclear receptor NHR-49. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (38):13496-13501.
- Van Gilst MR, Hadjivassiliou H, Jolly A, Yamamoto KR. 2005b. Nuclear hormone receptor NHR-49 controls fat consumption and fatty acid composition in *C. elegans*. *PLoS Biol*, 3 (2):e53.
- Wallace DC. 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*, 39:359-407.
- Washko ME, Rice EW. 1961. Determination of glucose by an improved enzymatic procedure. *Clin Chem*, 7:542-545.
- Weindruch R, Sohal RS. 1997. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N Engl J Med*, 337 (14):986-994.
- Weindruch R, Naylor PH, Goldstein AL, Walford RL. 1988. Influences of aging and dietary restriction on serum thymosin alpha 1 levels in mice. *J Gerontol*, 43 (2):B40-42.
- Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D. 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol*, 13 (22):2004-2008.
- Yoon M. 2009. The role of PPARalpha in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPARalpha actions. *Pharmacol Res*, 60 (3):151-159.
- Zarse K, Schulz TJ, Birringer M, Ristow M. 2007. Impaired respiration is positively correlated with decreased life span in *Caenorhabditis elegans* models of Friedreich Ataxia. *FASEB J*, 21 (4):1271-1275.
- Zhang BB, Zhou G, Li C. 2009. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab*, 9 (5):407-416.

Anhang

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich – Schiller – Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Prof. Dr. med. Michael Ristow
- Dr. rer. nat. Kim Zarse

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 29.10.2012

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name, Vorname: Brandstädt, Sven
Geburtsdatum, -ort: 09. Dezember 1983, Arnstadt
Familienstand: ledig

Bildung

1990 – 1994 staatliche Grundschule 3, Arnstadt
1994 – 2002 Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium, Arnstadt
Abschluss: Abitur
10/ 2003 – 10/ 2009 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
15.10.2009 Abschluss: Ärztliche Prüfung
2009 – dato Promotion am Lehrstuhl für Humanernährung des Instituts für Ernährungswissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. med. M. Ristow)

Berufliche Tätigkeit

06/2010 – 06/2011 Arzt in Weiterbildung im Fachbereich Orthopädie und Unfallchirurgie am Lehrstuhl für Orthopädie der Friedrich – Schiller- Universität Jena am Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“ in Eisenberg (Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. med. R. Venbrocks, Prof. Dr. med. W. D. Arnold)
07/2011 – dato Arzt in Weiterbildung im Fachbereich Orthopädie und Unfallchirurgie an den DRK Kliniken Berlin | Köpenick (Chefarzt: Dr. med. F. Reuther)

Jena, 29.10.2012

Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Michael Ristow, dieses Thema zusammen mit der Thematik für mich zu öffnen und die Arbeit hierüber anfertigen zu können. Insbesondere möchte ich mich bei ihm für die fortlaufende Unterstützung bedanken, die schließlich auch dann präsent war, wenn die Konzentration beim Verfassen der Arbeit längst abhanden kam und gerade gegen Ende großer Ansporn war. Daneben konnte ich erfahren, was es bedeutet, längst zu wissen Geglaubtes kritisch zu hinterfragen und wenn nötig einfach neu zu diskutieren.

Frau Dr. rer. nat. Kim Zarse möchte ich für ihre stetige Hilfe was die experimentelle und auch geistige Durchführung der Arbeit angeht, besonders danken.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe des Lehrstuhls für Humanernährung möchte ich mich für die jederzeitige Unterstützung, neben der freundlichen und immer gut gelaunten Atmosphäre bedanken, ohne die das Arbeiten nicht so viel Freude gemacht hätte.

Meinen Eltern danke ich für Ihre Unterstützung und Motivation auf dem Weg zur, aber auch nach der Promotion.

Vielen Dank Stefanie für die aufbauenden Worte und das Verständnis, falls es mal länger im Labor dauerte.

Ich danke allen Freunden für die entspannenden Stunden abseits der Promotion und die anhaltende Unterstützung.